

Isolierung und Charakterisierung einer
niedermolekularen DNA-Polymerase aus
Neurospora crassa

Gerhard Stauder

1981

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München

Isolierung und Charakterisierung einer
niedermolekularen DNA-Polymerase aus
Neurospora crassa

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gerhard Stauder
aus München

München 1980



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 1981

Abkürzungen	7
1. EINLEITUNG	9
1.1 Entdeckung der DNA-Polymerase	9
1.2 Die DNA-Replikation	10
1.3 DNA-Polymerasen in Prokaryoten	17
1.4 DNA-Polymerasen in höheren Eukaryoten	19
1.5 DNA-Polymerasen in niederen Eukaryoten	22
1.6 DNA-Polymerasen in <i>Neurospora crassa</i>	23
1.7 Problemstellung	25
2. MATERIAL	26
2.1 Verwendeter Stamm	26
2.2 Nährböden	26
2.3 Verwendete Chemikalien und Substanzen	27
2.4 Radioaktive Chemikalien	28
2.5 Filter und Dialyseschläuche	29
2.6 Scintillationslösungen	29
3. METHODEN	31
3.1 Anzucht von <i>Neurospora crassa</i>	31
3.1.1 Konidienzucht	31
3.1.2 Konidienstammkultur	32
3.1.3 Hyphenzucht	32
3.2 Aufarbeitung der Hyphen	33
3.3 Vorbereitung der Chromatographie-Säulen	34
3.3.1 DEAE - Cellulose	34
3.3.2 DNA - Cellulose	36
3.3.3 "Affi-Gel Blue"	37
3.4 Standardreaktionsansätze zur Messung der DNA - Polymerase - Aktivitäten	38
3.4.1 DNA - Polymerasen A und B	38
3.4.2 DNA - Polymerase C	39
3.5 Radioaktivitätsmessungen	39

3.6	Bestimmung des Einbaus von dNMP	40
3.7	Aktivierung von Kalbsthymus - DNA	41
3.8	Proteinteste	42
3.8.1	Nach der Methode von Lowry et al. (1951)	42
3.8.2	Nach der Methode von Schaffner & Weissmann (1973)	43
3.9	Test auf Nuklease - Aktivität	45
3.9.1	Endonukleasen	45
3.9.2	Exonukleasen	46
3.10	Agarose - Gelelektrophorese	46
3.11	Glyzeringradienten	47
3.12	Immunisierung und Gewinnung von Antiserum	47
3.13	Reinigung von IgG	48
3.14	Test auf Reaktion der Enzymaktivität mit IgG	49
3.15	Methoden zur Konzentrierung der DNA - Polymerase - Fraktionen	50
3.15.1	Konzentrierung in PEG 6000	50
3.15.2	Säurefällung	51
3.15.3	Alkoholfällung	51
3.15.4	Amicon - Filtration	51
3.15.5	Affinitätschromatographie an "Affi-Gel Blue"	52
3.15.6	Fällung mit Ammoniumsulfat	52
3.15.7	Konzentrierung im "batch"-Verfahren mit DEAE - Cellulose	52
4.	ERGEBNISSE	54
4.1	Entdeckung der poly(rA)(dT) abhängigen Polymerase-Aktivität und deren Trennung von den DNA-Polymerasen A und B	54
4.1.1	Entwicklung einer schnellen Aufarbeitungs- methode für Neurospora crassa Hyphen	54
4.1.2	Trennung und erste Reinigung von drei DNA-Polymerasen	55
4.1.3	Templateabhängigkeit	60
4.1.4	Test auf endogene Reaktion	62
4.1.5	Temperaturabhängigkeit	63
4.1.6	Ionenabhängigkeit	67
4.1.7	pH-Optimum	70
4.1.8	Abhängigkeit von Hemmstoffen	71
4.1.9	Abhängigkeit von DMSO	74

4.1.10	Einfluß nichtionischer Detergentien	75
4.1.11	Zwischenzusammenfassung	76
4.2	Weitere Reinigung der DNA - Polymerase C	78
4.2.1	Versuche zur Konzentrierung der DNA - Polymerase enthaltenden Fraktionen	78
4.2.2	Reinigung des C-Enzyms über weitere Chromatographie-Säulen	87
4.2.3	Haltbarkeit der hochgereinigten C-Enzymaktivität	91
4.2.4	Zwischenzusammenfassung	94
4.3	Weitere Charakterisierung des C-Enzyms	95
4.3.1	Immunologische Charakterisierung	96
4.3.2	Spezifität des homopolymer - abhängigen Einbaus	98
4.3.3	RNase Empfindlichkeit des Einbaus	99
4.3.4	Einfluß von EDTA auf die Aktivität	99
4.3.5	Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit	100
4.3.6	Abhängigkeit von der Enzymkonzentration	102
4.3.7	Abhängigkeit von der Substratkonzentration	102
4.3.8	Bestimmung der Michaelis-Konstanten	104
4.3.9	Test auf Reverse Transkriptase Aktivität mit heteropolymerer RNA	105
4.3.10	Thermische Inaktivierung	107
4.3.11	Test auf Anwesenheit von Nukleasen	110
4.3.12	Molekulargewichtsbestimmung im Glyzeringradienten	113
5.	DISKUSSION	116
6.	ZUSAMMENFASSUNG	124
7.	LITERATURVERZEICHNIS	126
APPENDIX 1:	Danksagung	137
APPENDIX 2:	Lebenslauf	138

Abkürzungen

Template	Polynukleotidstrang, der von der DNA-Polymerase kopiert wird
Primer	Polynukleotidstrang mit freiem 3'-OH-Ende an dem der wachsende DNA-Strang kovalent verlängert wird
NEM	N-Ethyl-Maleimid (Hemmstoff)
pCMB	para-Chloromercuribenzoat (Hemmstoff)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
KT-DNA	Kalbsthymus-DNA, durch teilweisen DNase-Verdau aktiviert (dient als Template)
poly(dA)(dT)	Poly-desoxy-adenylsäure-oligo-desoxy-thymidylsäure
poly(rA)(dT)	Polyadenylsäure-oligo-desoxy-thymidylsäure
poly(rC)(dG)	Polycytidylsäure-oligo-desoxy-guanylsäure
poly(mC)(dG)	Poly-2'-o-methyl-cytidylsäure-oligo-desoxy-guanylsäure
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dTMP	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat

dNMP	2'-Desoxynukleosid-5'-monophosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat (Hemmstoff)
BSA	Rinderserumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
LN ₂	flüssiger Stickstoff
PP	Natriumpyrophosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
V.T.	Volumenteile

Die Meßeinheiten beziehen sich auf das neue SI-Einheiten-system (Gundlach G. & Dillmann A., 1977).

Für die Bezeichnung der Mikro-Einheiten wurde anstelle des griechischen " μ " der Buchstabe "u" vorgesetzt (ul, umol usw. = μ l, μ mol usw.).

1. EINLEITUNG

1.1 Entdeckung der DNA-Polymerase

Ein grundlegendes Problem der Genetik ist die Frage der Replikation genetischer Information auf molekularer Ebene.

Spätestens seit den Versuchen von Avery, MacLeod und MacCarty (1944) ist bekannt, daß die Desoxyribonukleinsäure (=DNA) Träger der genetischen Information ist.

Die Arbeiten von Watson J.D. & Crick F.H.C. (1953) und besonders die von Meselson M. & Stahl F.W. (1958) zeigten, daß die Verdopplung einer Zelle mit der identischen Reduplikation der DNA einhergeht. Es konnte gezeigt werden, daß die DNA "semi-konservativ" verdoppelt wird, d.h. daß die beiden Stränge einzeln als Matrize für je einen neuen Strang dienen, mit dem sie dann durch Wasserstoffbrücken zum neuen Doppelstrang verbunden werden.

Nicht aufgeklärt wurde durch diese Arbeiten aber der Mechanismus, wie dieser Vorgang ablaufen sollte. Da die beiden DNA-Stränge gegenläufig sind, müßte ein Strang vom 3'- zum 5'-Ende, der andere vom 5'- zum 3'-Ende neusynthetisiert werden; oder ein Strang würde kontinuierlich, der andere in Teilstücken hergestellt, die dann aber verbunden werden müßten. Weitere Probleme stellten sich durch die

Helix-Struktur der DNA: wie kann die Spirale schnell genug entwunden werden? Zur Beantwortung dieser Fragen war es zunächst notwendig, die an der DNA-Replikation beteiligten Enzyme zu finden. A. Kornberg und Mitarbeitern gelang es schließlich, aus Extrakten von *Escherichia coli* ein Enzym zu isolieren, das *in vitro* die Synthese von DNA katalysierte (Kornberg A., et al., 1956; Lehman I.R., et al., 1958; Bessman M.J., et al., 1958; Kornberg A., 1960): nach Zugabe der vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, sowie einer einzelsträngigen DNA als Template, entstand eine doppelsträngige DNA. Auch wurde ^{14}C -markiertes dTTP in eine säureunlösliche Form (die DNA) eingebaut. Lange Zeit wurde angenommen, daß die DNA-Polymerisation allein von diesem Enzym katalysiert würde. Heute ist aber bekannt, daß diese "Kornberg-Polymerase" nur eine von mehreren Polymerasen darstellt. Sie wird jetzt als "DNA-Polymerase I" bezeichnet.

Viele Versuche folgten, und im Laufe der Zeit konnten solche "DNA-Polymerasen" (DNA-Nukleotidyl-Transferase, E.C. 2.7.7.7.) aus mehreren prokaryotischen und eukaryotischen Zellen isoliert werden.

1.2 Die DNA-Replikation

Die Desoxyribonukleinsäuren (DNA) sind praktisch stoffwechselinerte Verbindungen von außerordentlich hohem Molekulargewicht (10^6 bis über 10^9 d). Zwischen den Zellteilungen sind die DNAs nahezu völlig stabil.

Die Kenntnisse über die Bedeutung und die Funktion der Nukleinsäuren stammen vorwiegend aus Untersuchungen an prokaryoten Zellen, dabei insbesondere an *Escherichia coli*.

Jeder Zellteilung geht eine identische Reduplikation der DNA voraus. Dabei wird zu jedem der beiden, basenkomplementären Elternstränge je ein neuer komplementärer Tochterstrang synthetisiert, wobei ein Elternstrang als Matrize (Template) dient. Damit entstehen bei jedem Replikationszyklus aus einem Doppelstrang jeweils zwei Doppelstränge, wobei immer ein vollständiger Einzelstrang aus dem ursprünglichen Elterndoppelstrang stammt. Diese Art der DNA-Verdopplung wird als "semi-konservativ" bezeichnet (vgl. 1.1).

Obwohl in den letzten Jahren gerade auf dem Gebiet der Replikation genetischen Materials sehr viel untersucht und gefunden wurde, sind auch heute noch sehr viele Fragen in diesem Feld der Molekularbiologie offen.

Die DNA-Synthese läuft in einem hoch empfindlichen Multi-komponenten-System ab, das in höheren Zellsystemen bis heute noch nicht in einer funktionellen Form isoliert werden konnte.

Bei niederen Zellen wurden in den vergangenen Jahren bedeutende Fortschritte gemacht in der Aufklärung des Synthesemechanismus von prokaryotischer DNA (Alberts B.M. & Fry L., 1970; Übersicht in Alberts B. & Sternglanz R., 1977). Die enzymatischen Vorgänge wurden untersucht z.B. bei den Phagen M13 (auch fd oder f1 bezeichnet), ϕ X174 und G4

(Kornberg A., 1979).

Alle diese Untersuchungen haben gezeigt, daß selbst in diesen kleinen Genomen das Zusammenwirken der Enzyme bei der Replikation weitaus komplizierter als zuvor angenommen organisiert ist.

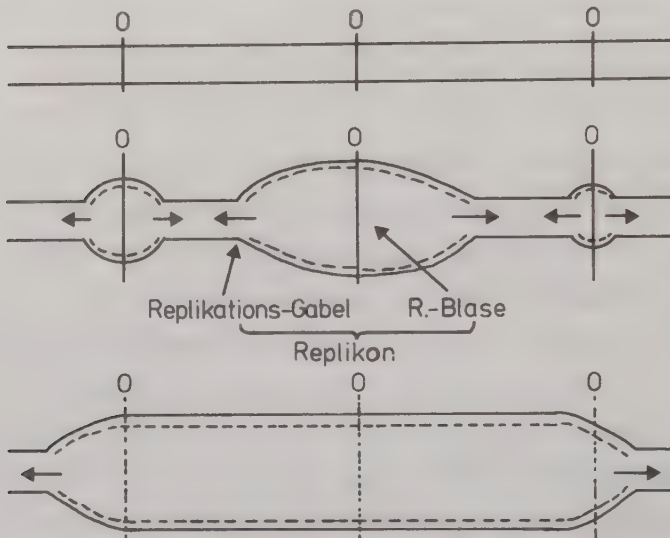
Beim Phagen M13 beispielsweise, der eine einsträngige, zirkuläre DNA als Genom enthält, bindet zunächst ein "DNA binding protein" an die DNA. Die Sekundärstruktur wird dabei aufgelöst. An eine bestimmte Region lagert sich eine RNA-Polymerase an und synthetisiert den RNA-Primer, der dann von einem DNA-Polymerase-Komplex ("DNA-Polymerase III-Holoenzym") verlängert wird. Der Primer wird abgebaut und die Lücke von der DNA-Polymerase I gefüllt. Der synthetisierte neue Strang wird von einer Ligase zum Ring geschlossen und bildet, zusammen mit dem ursprünglichen Ring, die "replikative Form", eine doppelsträngige zirkuläre DNA (Kornberg A., 1979).

Die Fortschritte auf dem Gebiet Mechanismus und Regulation der DNA-Replikation in Eukaryoten dagegen waren bedeutend bescheidener. Dafür sind mehrere Faktoren verantwortlich: im Gegensatz zu den Prokaryoten fehlen hier geeignete Mutanten, die spezifische Untersuchungen im DNA-polymerisierenden System zuließen (ts-Mutanten), der DNA-Gehalt eukaryoter Zellen ist bis zu 1000mal höher als der von Prokaryoten und während in Prokaryozyten das Genom aus einem einzelnen DNA-Molekül besteht, ist es in eukaryoten Zellen in mehrere Chromosomen aufgeteilt, in denen die DNA eng

verbunden mit chromosomalen Proteinen vorliegt, z.T. den Histonen, die eine wichtige Rolle spielen. So muß hier nicht nur die DNA verdoppelt werden, sondern der gesamte Chromosomensatz. Dazu ist Voraussetzung, daß diese Synthese von DNA, Histonen und anderen chromosomalen Proteinen einer strengen Regulation unterworfen sein muß. Der zeitliche Abschnitt, in dem diese Reduplikationen bei jedem Zellteilungszyklus ablaufen, wird als "S-Phase" bezeichnet.

Die DNA-Polymerase (veraltete Bezeichnung "Replicase") synthetisiert nur vom 5'- zum 3'-Ende. Um hohe Geschwindigkeiten zu erreichen, wird gleichzeitig an mehreren Stellen repliziert (bei Eukaryoten an 500 bis 10.000 Stellen). Von diesen Stellen aus ("origins of replication") erfolgt die DNA-Neusynthese nach beiden Richtungen und stellt zusammen mit allen notwendigen Enzymen und Faktoren (s. unten und Abb. 2) eine "Replikationseinheit" dar. Eine solche Einheit wird als "Replikon" bezeichnet. Zu beiden Seiten der Initiationsstelle in einem solchen Replikon befinden sich die "Replikationsgabeln", in denen die Auftrennung der Doppelhelix erfolgt. Die Replikationsgabeln benachbarter Replikons bewegen sich aufeinander zu und zwar solange, bis sie zusammentreffen (Abbildung 1). Bestimmte Nukleotidsequenzen für die origins of replication sind bei Eukaryoten bisher noch nicht gefunden worden, wohl aber bei Prokaryoten (Wintersberger E., 1978). Terminationspunkte für Replikons gibt es keine, was mit Deletionsmutanten von SV40-DNA bewiesen wurde (Brockman W.W., et al., 1975; Lai C.J. & Nathans D., 1975): die Terminationsstelle

liegt bei diesen ringförmigen DNA-Molekülen, beim Wildtyp wie bei der Mutante, immer 180° vom Origin entfernt, damit aber an verschiedenen Stellen des Genoms.



O = Origin (Startpunkt der Replikation)

Abbildung 1. Schema der DNA-Replikation mit Replikons.

Eine Neusynthese von DNA erfolgt nur nach vorangegangener Synthese eines "RNA-Primers" (ca. 40 - 50 Nukleotide) an dem als Template dienenden DNA-Einzelstrang, wozu eine RNA-Polymerase (= "Primase") benötigt wird. An diesen Primer werden, stets von der DNA-Polymerase α (bei Eukaryoten; DNA-Polymerase III-Holoenzym bei Prokaryoten), die ersten Desoxynukleotide angehängt. Die weitere Replikation erfolgt dann von der DNA-Polymerase α , β oder γ (bzw. DNA-Polymerase I, II oder III bei Prokaryoten) - (vgl. Weissbach A., 1979 und

Kornberg A., 1979).

Einer der beiden DNA-Elternstränge (der "leading strand") wird dabei kontinuierlich vom 5'- zum 3'-Ende hin synthetisiert. Für den komplementären Elternstrang (den "lagging strand") dagegen werden kurze DNA-Stücke (ebenfalls von 5' nach 3') synthetisiert, die sogenannten "Okazaki-Fragmente", die erst anschließend verknüpft werden. Diese Verknüpfung katalysiert das Enzym "DNA-Ligase".

Am Ende der Synthese werden die RNA-Primer von einer "RNase H" wieder abgespalten (Wintersberger E., 1978).

Um jedoch diesen Enzymen den Zugriff zu der gewundenen DNA-Doppelhelix zu ermöglichen, muß zunächst an den Replikationsgabeln ein "unwinding enzyme" die Aufhebung der nicht-kovalenten Bindungen zwischen den beiden Einzelsträngen katalysieren und das Enzym "swivelase" die bei der Aufspaltung entstehenden Verdrillungen aufheben. Dieses "Entdrillungsenzym" hat gleichzeitig die Eigenschaft einer Endonuklease und einer Ligase. Es wird bei E. coli auch als "ω-Protein" bezeichnet (Carlson J.O. & Wang J.C., 1974).

Der dann freiliegende DNA-Einzelstrang wird von DNA-bindenden Proteinen stabilisiert, um seine Funktion als Template ausüben zu können. Ein "dnaB-Protein" schließlich ermöglicht der RNA-Polymerase, den Primer zu synthetisieren (Abbildung 2).

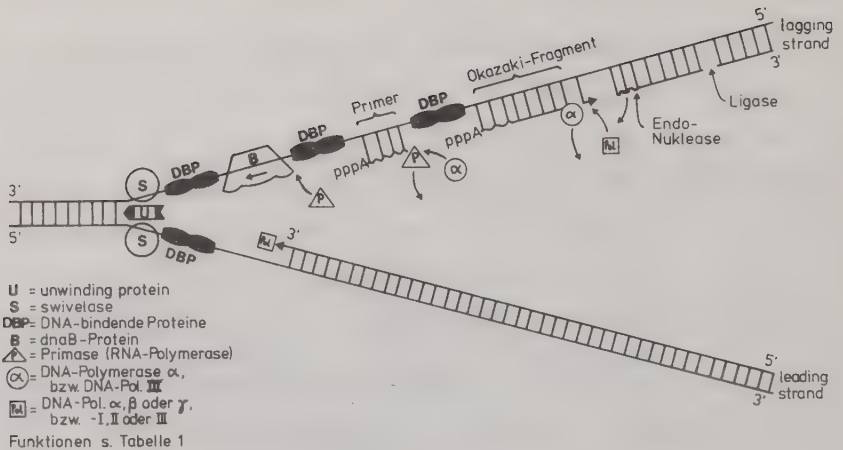


Abbildung 2. Enzymaktivitäten (hypothetisch) an einer Replikationsgabel.

Als Beispiel aber dafür, daß es noch viele weitere Faktoren geben kann, sei erwähnt, daß in jüngster Zeit von Benz jr. und Mitarbeitern gezeigt werden konnte, daß zur Initiation der DNA-Synthese beim E. coli-Phagen $\alpha 3$ noch ein sogenanntes "dnaG-Protein" notwendig ist (Benz E.W. jr., et al., 1980). Dessen Funktion ist aber noch nicht bekannt; vermutet wird eine (weitere?) Polymerase-Aktivität.

Tabelle I. WICHTIGE, AN DER REPLIKATION VON DNA BETEILIGTE
ENZYME UND FAKTOREN

Enzym/Faktor	Funktion
RNA-Polymerase ("Primase")	Initiation der DNA-Synthese ("Primer")
DNA-Polymerasen	DNA-Synthese aus Desoxynukleotiden
RNase H	Trennung von kovalent gebundener DNA u. RNA (Abspaltung des Primers)
DNA-Ligase	Verknüpfung der Okazaki-Fragmente
"Unwinding enzyme" ("Gyrase")	Aufspaltung des DNA-Doppelstranges an der Replikationsgabel
"swivelase"	Aufhebung der bei der Aufspaltung ent- stehenden Verdrillungen
DNA-bindende Prot.	Stabilisierung der DNA-Einzelstränge
"dnaB-Protein"	Initiation für den Primer

1.3 DNA-Polymerasen in Prokaryoten

Obwohl Experimente über DNA-Polymerase-Aktivitäten zuerst im Säugersystem, an Rattenleber, durchgeführt worden sind (Bollum F.J. & Potter V.R., 1957), wurden genauere Erkenntnisse darüber doch zunächst an prokaryoten Zellen gewonnen, dabei vor allem an *Escherichia coli*.

Die erste aus *E. coli* isolierte DNA-Polymerase (Kornberg A., 1960) wurde als "Kornberg-Polymerase" (heute DNA-Polymerase I) bezeichnet. Lange Jahre wurde angenommen, daß dies die einzige wäre. Erst 1970/71 wurden in *E. coli* zwei weitere DNA-polymerisierende Enzyme entdeckt (Kornberg T. & Gefter M.L., 1970; dieselben, 1971). Später fand man dann ebenfalls drei Polymerasen unter anderem auch in *Bacillus subtilis* und *Micrococcus luteus* (Kornberg A., 1974).

Heute gibt es keinen Zweifel mehr, daß diese drei DNA-Polymerasetypen in vielen, wenn nicht allen Bakterien enthalten sind (Übersicht in Holmes A.M. & Johnston I.R., 1975).

Tabelle II. PROKARYOTISCHE DNA-POLYMERASEN

DNA-Polymerase	I	II	III
Molekulargewicht	109.000	90-120.000	140-180.000
bevorzugtes Template*	aktiv.DNA	off. DNA	off. DNA
Moleküle pro Zelle	400	20	10
Hemmung durch NEM	-	+	+
Entdeckung	1969	1970	1971
Funktion	Replikation	Reparatur?	Replikation

* aktiv.DNA = "aktivierte" DNA; DNA-Doppelstrang mit Einzelstrangbrüchen
 off. DNA = "offene" DNA; DNA-Doppelstrang mit größeren Einzelstranglücken
 Die Einzelstrangbrüche und -lücken wurden durch teilweisen DNase-Verdau erzeugt.

1.4 DNA-Polymerasen in höheren Eukaryoten

Wie bei den Prokaryoten gibt es auch bei den höheren Eukaryoten wenigstens drei DNA-Polymerasen (α , β und γ), die sich deutlich unterscheiden (z. B. in ihrer Ladung, im Molekulargewicht, in ihrer Sensitivität gegenüber Hemmstoffen, in der Templateabhängigkeit und immunologisch). Eines der wichtigsten Unterscheidungskriterien ist dabei die Templatespezifität. Die einzelnen Polymerasetypen reagieren mit verschiedenen Template-Primer-Komplexen (z.B. aktivierte DNA, poly(dA)(dT), poly(rA)(dT), poly(rC)(dG), u.a.) mehr oder weniger gut. Vor allem die Annahme synthetischer Templates ist sehr spezifisch (Übersicht in Weissbach A., 1977). Die Proteinketten der verschiedenen Polymerasetypen weisen keine identischen Peptidsequenzen auf und sind nicht ineinander umzuwandeln. Es sind nicht verschiedene Formen desselben Proteins, die sich z.B. nur in Seitenketten, kurzen Peptidsequenzen (Primärstruktur) oder in der Sekundärstruktur unterscheiden, sondern verschiedene Proteine (Spadari S. & Weissbach A., 1974).

Allerdings sind sich gleiche DNA-Polymerasen aus Zellen verschiedener Herkunft ähnlich.

Nachdem Bollum als erste DNA-Polymerase in höheren Eukaryoten die α -Polymerase entdeckt und untersucht hatte (Bollum F.J., 1960), fanden Weissbach und Mitarbeiter schließlich 1971 die β - (Weissbach A., et al., 1971) und 1975 die γ -Polymerase (Weissbach A., 1975).

Die Mitochondrien enthalten eine weitere DNA-Polymerase (Polymerase-mt). Sie wurde schon 1968 von Kalf und Ch'ih

untersucht (Kalf G.F. & Ch'ih J.J., 1968). Bolden und Mitarbeiter berichten aber, daß diese mt-Polymerase in einer Lösung mit hohem Salzgehalt gleiche Eigenschaften zeigt wie die γ -Polymerase (Molekulargewicht, Templatespezifität, KCl-Optimum, Hemmstoffabhängigkeit, Temperaturstabilität, Verhalten auf DEAE-Cellulose, Phosphocellulose und DNA-Cellulose sind identisch). Möglicherweise stellt sie daher nur eine andere Form der γ -Polymerase dar (Bolden A., Pedrali Noy G. & Weissbach A., 1977).

Die Funktionen der einzelnen DNA-Polymerasen sind nicht bekannt. Es gibt aber Hinweise darauf, daß die DNA-Polymerase α wichtig ist für die DNA-Replikation, da die α -Polymerase die höchste Aktivität in wachsenden Zellen zeigt (Chang L.M.S. & Bollum F.J., 1973), die β -Polymerase dagegen in ruhenden Zellen (Craig R.K., Castello P.A. & Keir H.M., 1975).

Nur kurz erwähnt sein sollen hier die vielen virus-induzierten DNA-Polymerasen (reverse Transkriptasen, Wu A.M. & Gallo R.C., 1975, oder andere, Weissbach A., 1975), die nur nach viraler Infektion auftreten, sowie die Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TdT), die wahrscheinlich ein nicht replikatives Enzym mit unbekannter, spezieller Funktion darstellt (Bollum F.J., et al., 1974).

Weitere DNA-Polymerasen wurden entdeckt und beschrieben u.a. in *Euglena gracilis* (McLennan A.G. & Keir H.M., 1975), in einem Blat tumor des Immergrüns (Gardner J.M. & Kado C.I., 1976), in *Dictyostelium discoideum* (Loomis L.W., et al.,

1976), in Mäusezellen (Livingston D.M., et al., 1974), in Leukose-Virus-freien Hühnereiern (Bauer G. & Hofschneider P.H., 1976), sowie in menschlichen KB- (Wang T.S.F., et al., 1975) und Leukämie-Zellen (Mordoh J. & Fridlender B.R., 1975).

Bei all diesen Enzymen muß aber erst geklärt werden, ob es sich dabei nicht doch um bereits bekannte oder aber virus-induzierte DNA-Polymerasen handelt.

Neuerdings gibt es Berichte über die Isolierung einer DNA-Polymerase δ . Zunächst wurde sie isoliert aus dem Knochenmark von Kaninchen (Byrnes J.J., et al., 1976; 1977; 1978), später auch aus Kalbsthymus (Lee M.Y.W.T., et al., 1980). Die Autoren vermuten aber, daß sie verwandt ist mit einer der von anderen Laboratorien isolierten verschiedenen Formen der α -Polymerase (Yoshida S., et al., 1974; Holmes A.M. & Johnston I.R., 1975; Hasslewood I.P., et al., 1978).

Tabelle III. EUKARYOTISCHE DNA-POLYMERASEN

DNA-Polymerase:	α	β	γ	δ	mt
Molek.gewicht	>100.000	<50.000	>100.000	152.000	150.000
Templates: *					
aktiv. DNA	++	++	+/-	+	?
p(rA)(dT)	-	+	++	?	?
zirkul. DNA	-	-	-	?	++
Hemmung durch:					
NEM	+	-	+	+	+
pCMB	+	+	+	?	?
Actinomycin D	+	?	?	?	?
Entdeckung	1960	1971	1972	1978	1968

* aktiv. DNA = aktivierte DNA; DNA mit Einzelstrangbrüchen
 p(rA)(dT) = poly(rA)(dT); synthetische RNA mit RNA-Primer
 zirkul.DNA = zirkuläre DNA; kovalent geschlossener DNA-Ring

1.5 DNA-Polymerasen in niederen Eukaryoten

Der Wissensstand über DNA-Polymerasen in diesen Organismen befindet sich noch im Stadium der Beschreibung. Die meisten Erkenntnisse stammen bisher aus Untersuchungen an Prokaryoten und höheren Eukaryoten. Da von niederen Eukaryoten wie von Prokaryoten DNA-Polymerase-ts Mutanten

bekannt sind (Jeggo P.A., et al., 1973), versprechen z.B. Hefen oder Pilze, die DNA-Polymerase-Studien zu vervollständigen.

So wurden Experimente durchgeführt mit dem Basidiomyzeten-Pilz *Ustilago maydis* (Banks G.R., et al., 1976). Dort fanden die Autoren nur eine einzige DNA-Polymerase. Wintersberger E. (1974) und Wintersberger U. (1974) untersuchten die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie konnten nur zwei hochmolekulare DNA-Polymerasen nachweisen und fanden keine β -ähnliche, niedermolekulare Polymerase.

1.6 DNA-Polymerasen in *Neurospora crassa*

Es zeigte sich, daß verschiedene Bakterienmutanten mit Polymerasedefekten (pol^- -Mutanten) UV-sensitiv sind.

Da von dem Ascomyzeten *Neurospora crassa* mehrere UV-sensitive Mutanten erzeugt werden konnten und außerdem in diesem Pilz verschiedene Differenzierungsstadien gut zu isolieren sind, lag es nahe, hier ebenfalls nach DNA-polymerisierenden Enzymen zu suchen.

Dieser eukaryote Pilz enthält in seinem Kern einen haploiden Satz von sieben Chromosomen ohne Histone (Dupraw E.J., 1970; Leighton T.J., et al., 1971). Es findet sich doppelsträngige DNA sowohl im Kern, als auch in den Mitochondrien. In den letzteren liegt sie teilweise zirkulär vor (Dupraw E.J., 1970).

Erstmals gelang es Ellassouli S.M. und Mishra N.C. (1977), ein einzelnes Enzym, das DNA-Polymerase-Aktivität zeigte, aus einem zellfreien Extrakt von *Neurospora crassa* zu isolieren.

Schließlich war es in diesem Labor möglich, zwei unterschiedliche zytoplasmatische und eine mitochondriale DNA-Polymerase aus Hyphen von *Neurospora crassa* zu isolieren (Joester K.-E., et al., 1977; Joester W., et al., 1978; Dissertationen Joester W. und Joester K.-E., in Vorbereitung), die von den Autoren mit DNA-Polymerase A und B bezeichnet wurden.

Verschiedene enzymatische und physikalische Eigenschaften lassen darauf schließen, daß es sich dabei um Enzyme handelt, die den α - bzw. γ -Polymerasen der höheren Eukaryoten ähnlich sind.

Außerdem fanden Joester W. und Joester K.-E. Hinweise auf das Vorhandensein einer weiteren DNA-Polymeraseaktivität in diesem Pilz (persönliche Mitteilungen).

Da es sich hierbei möglicherweise um ein drittes, von A und B verschiedenes und damit vielleicht den β -Polymerasen höherer Eukaryoten vergleichbares Enzym handeln könnte, wurden Versuche unternommen, diese dritte Aktivität zu reinigen und zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in dieser Arbeit niedergelegt.

1.7 Problemstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war also zunächst, das Vorhandensein einer dritten DNA-polymerisierenden Aktivität in *Neurospora crassa* zu überprüfen.

Sollte diese Aktivität wieder gefunden werden, müßte diese isoliert und möglichst hoch gereinigt und enzymologisch charakterisiert werden.

Es war zu prüfen, ob es sich dabei um ein eigenes Protein handelt, oder nur um eine unterschiedliche Form einer der beiden anderen bereits gefundenen Polymerasen A oder B.

Falls es sich um ein weiteres, nicht mit A oder B verwandtes Enzym handelte, sollte gezeigt werden, ob dieses den β -Polymerasen höherer Eukaryoten vergleichbar ist.

Damit möchte diese Arbeit einen Beitrag leisten zu der Aufklärung über den zur DNA-Synthese notwendigen enzymatischen Gehalt niederer Eukaryoten, die eine Brücke darstellen zwischen Prokaryoten und den höheren Organismen.

Erst wenn alle, oder doch wenigstens die wichtigsten dieser Enzyme bekannt sind, wird es möglich sein, die Rollen zu studieren, die diese bei der Replikation spielen. Dann wird man beginnen können, die einzelnen Schritte der DNA-Synthese enzymatisch zu rekonstruieren.

2. MATERIAL

2.1 Verwendeter Stamm

Die Isolierung der DNA-Polymerasen erfolgte aus dem Wildtyp-Stamm *Neurospora crassa* WT 74A.

2.2 Nährböden

Zum Anzüchten der Konidien, die zum Beimpfen der Flüssigkultur notwendig sind, wurde folgendes Konidienzuchtmedium verwendet:

Vogel's Minimal 50x (Vogel, 1956)	20,0 ml
Glyzerin	10,0 ml
Saccharose	10,0 g
Hefe-Extrakt	2,5 g
Caseinhydrolysat	1,0 g
Vitaminlösung	10,0 ml
Folsäure (1 mg/ml in H ₂ O)	0,01 ml
Cholinchlorid (10 mg/ml in H ₂ O)	0,1 ml
Inositol (10 mg/ml in H ₂ O)	0,1 ml

Die angegebenen Mengen wurden in 1 Liter dest. Wasser gelöst und pro Zuchtkolben davon 50 ml zuzüglich 1 g Bacto-Agar eingesetzt.

Für die Stammkulturen genügte dieses Medium:

Vogel's Minimal 50x	20,0 ml
Glukose	10,0 g
in 1 Liter dest. Wasser lösen.	

Pro Kolben wurden davon 50 ml und je 1 g Agar verwendet.

Die Flüssigkultur erfolgte in nachstehendem Hyphenzucht-Medium:

200 ml Vogel's Minimal 50x wurden mit dest. Wasser auf 9600 ml aufgefüllt, autoklaviert und anschließend mit 400 ml 50%iger Glukose versetzt.

2.3 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Serva, Heidelberg
Aldolase	Boehringer, Mannheim
Amidoschwarz 10 B	Serva, Heidelberg
DNA aus Kalbsthymus	Sigma, München
DNase I, RNase-frei	Worthington, Freehold, New Jersey
Endonuklease Eco RI	Boehringer, Mannheim
Freund'sches Adjuvans, komplett	Behringwerke, Marburg
Katalase	Boehringer, Mannheim
NP 40	Fluka, Neu-Ulm
Ribonuklease (RNase) T 1	Sigma, München
Triton X 100	Serva, Heidelberg
Hemmstoffe:	
Actinomycin D	Sigma, München

ddTTP	Boehringer, Mannheim
NEM	Sigma, München
pCMB	CalBiochem, Luzern

Nukleotide:

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer, Mannheim
------------------------	----------------------

Templates, Primer:

poly(rA)(dT) ₁₂ , poly(rC)(dG) ₁₂ ,	
poly(mC)(dG) ₁₂ , poly(dA)(dT) ₁₀ ,	
oligo(dT) ₁₂	Boehringer, Mannheim

Chromatographie-Material:

DE 22, DE 23, DE 52	Whatman, England
Cellex 410, Affi-Gel-Blue	Bio-Rad, München
alle anderen Chemikalien	Merck, Darmstadt

³H-E. coli-DNA (4000 cpm/ug) und
 pSF2124-DNA (75% zirkulär geschlossen) waren ein
 Geschenk von K.-E. Joester,
 Reverse Transkriptase aus AMV ein solches von R. Soo
 und
 Globin-mRNA von N. Wichmann.

2.4 Radioaktive Chemikalien

[³ H] - Deoxyguanosin-5'-triphosphat	
(³ H-dGTP), 17 Ci/mmol = 0,63 TBq/mmol	Schwarz/Mann, New York
[methyl- ³ H] - Thymidin-5'-triphosphat	
(³ H-dTTP), 30 Ci/mmol = 1,11 TBq/mmol	Amersham, England

2.5 Filter und Dialyseschläuche

Zur Filtration der säurefällbaren Radioaktivität, sowie beim Proteintest nach Schaffner & Weissmann wurden Selectron-Membranfilter Typ BA 90 der Firma Schleicher & Schüll, Dassel, verwendet (0,6 μ m Porengröße).

Zum Sammeln der gezüchteten Hyphen kamen Papierfilter der Firma Schleicher & Schüll, Dassel, Nr. 595 zum Einsatz.

Die Dialyseschläuche wurden bezogen von Union Carbide, Chicago und wie folgt vorbehandelt (McPhie P., 1971):

15 Minuten kochen in 0,1 mol/l NaHCO_3 ;

1 Stunde rühren in 0,01 mol/l EDTA;

mehrmals spülen mit sterilem Wasser und bei 4°C in sterilem dest. Wasser aufbewahren.

2.6 Scintillationslösungen

Für die Messung von Radioaktivität auf Filtern wurde folgende Lösung verwendet:

5 g Diphenyloxazol (PPO) und 0,3 g Methyl-phenyl-oxazolyl-benzol (POPOP; beides von Koch-Light, Colnbrook, England) wurden in 1 Liter Toluol gelöst. Pro Gläschen wurden 5 ml dieses Scintillationsmixes eingesetzt.

Später wurde jedoch der fertige Scintillationsmix "Quickszint 501" von der Firma W. Zinsser, Frankfurt, verwendet.

Radioaktivität in Flüssigkeit wurde in "Aquasol-2" von New England Nuclear, Boston, Massachusetts, gemessen.

3. METHODEN

3.1 Anzucht von *Neurospora crassa*

Die Zucht von *Neurospora crassa* und die Aufarbeitung wurde in Anlehnung an die Methoden von Rhodes C. et al. (1971), Luck D.J.L. (1967) und Busch H. (1968) entwickelt.

3.1.1 Konidienzucht

Zunächst wurde ein 300 ml - Erlenmeyerkolben mit Konidienzuchtmedium aus der Stammkultur angeimpft und eine Woche bei 30° C inkubiert.

Das gewachsene Myzel wurde dann auf etwa 20 Zuchtkolben (300 ml Erlenmeyerkolben mit Konidienzuchtmedium) verteilt. Die mit luftdurchlässigen Silikosestopfen (Fa. Tecnomara, Zürich, Schweiz) verschlossenen Kolben wurden wiederum eine Woche bei 30° C inkubiert.

Das Ablösen des Myzels erfolgte durch Zugabe von 10 - 20 ml sterilen Wassers pro Kolben und Abschaben mit einem Gummiwischer. Die gesammelten Hyphen wurden im Wasser 30 Minuten gerührt und anschließend durch sterile Watte filtriert. Der Durchlauf wurde auf 10^8 Konidien/ml durch Zugabe sterilen Wassers eingestellt.

3.1.2 Konidienstammkultur

Erlenmeyerkolben mit Stammkulturmedium wurden mit Konidien beimpft und blieben bei 20° C, mit luftdurchlässigen Silikosestopfen verschlossen, stehen. Etwa einmal monatlich wurde auf frische Kolben überimpft.

Man könnte die Konidien für mehrere Jahre auch aufbewahren in Behältern mit p-Dichlorbenzol (Mottenkugeln) nach vorsichtigem Trocknen, in sterilem Mineralöl, lyophilisiert oder in flüssigem Stickstoff (Taber W.A. & Taber R.A., 1974; Norris J.R. & Ribbons D.W., 1969; Martin S.M., 1963). Diese Methoden kamen allerdings hier nicht zur Anwendung.

3.1.3 Hyphenzucht

Drei 15 l-Kolben mit je 10 l Hyphenzuchtmedium wurden mit je ca. 10^{10} Konidien beimpft.

In einem New Brunswick Fermenter (Serie FS 300) wuchsen die Hyphen gut belüftet 20 - 24 Stunden bei 30° C.

Die Ernte erfolgte durch Filtration in einer Porzellannutsche mit 18 cm Durchmesser über ein Papierfilter (Schleicher & Schüll, Nr. 595).

Nach dem Trockensaugen des gesammelten Myzels ergab sich ein Gewicht von etwa 500 - 700 g. Bis zur Verwendung wurden diese Hyphen bei -80° C oder in LN_2 eingefroren.

Einmal wurde auch gefrorenes Material (-80° C) vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München

freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2 Aufarbeitung der Hyphen

Die gefrorenen Hyphen (-80°C) wurden (steril verpackt) mit einem Hammer grob zerkleinert und in einem Waring Blendor Mixer pulverisiert. Bei 10°C wurden sie nun langsam aufgetaut und mit 4 V.T. TEM-Puffer versetzt, welcher 0,44 mol/l Sucrose enthielt (TEM = 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l β -Mercaptoäthanol; enthielt der Puffer noch 10% Glyzerin, wurde er mit TEMG bezeichnet).

Die Suspension wurde in einem Sorvall Omni-Mixer homogenisiert, in der Weiss-Mühle (Weiss et al., 1970) zermahlen und 30 Minuten gerührt.

Nach einer niedertourigen Zentrifugation (600 g / 30 min) wurde der Überstand durch Gaze filtriert.

Es folgte eine hochtourige Zentrifugation (100.000 g / 1 Stunde). Im Sediment befanden sich die Mitochondrien, der Überstand wurde nochmals durch Mull filtriert.

Zu dem Durchlauf wurde Glyzerin bis zu einer Endkonzentration von 10% gegeben.

Aus dieser Lösung wurden dann säulenchromatographisch die DNA-Polymerasen isoliert.

3.3 Vorbereitung der Chromatographie-Säulen

3.3.1 DEAE - Cellulose

Die Methodik zur Ionenaustausch-Chromatographie entstammt folgenden Quellen: Bailey J.L. (1967), Heftmann E. (1967), Determann H. (1969), Fisher L. (1969) und Himmelhoch S.R. (1971).

Die DEAE-Cellulose (DE 22 oder DE 23) wurde mit 10 V.T. 0,5 mol/l HCl versetzt, 15 min gerührt, 20 min stehen gelassen, dekantiert und filtriert. Mit H₂O wurde bis zu einem pH-Wert von 4,0 gewaschen. Es folgte die gleiche Behandlung mit 0,5 mol/l NaOH. Gewaschen wurde jetzt, bis der pH-Wert nahezu neutral war.

Die so vorbehandelte Cellulose wurde in TEMG-Puffer aufgenommen, an der Wasserstrahlpumpe entgast und wieder filtriert.

Anschließend wurde sie in 30 ml TEMG pro Gramm (Ausgangs-)Trockengewicht eingerührt. Dann wurde sie in einen Meßzylinder gegossen, um absitzen zu können. Die Zeit ergibt sich aus Formel (1):

$$t \text{ (min)} = 1,5 \times h \text{ (cm)} \quad (1)$$

wobei t die Zeit zum Absitzen in Minuten und h die Höhe der Suspension im Meßzylinder in cm ist. Das sich nach dieser Zeit ergebende Volumen der Cellulose sei V₁.

Der Puffer wurde soweit abgesaugt, bis das Volumen gleich $V_1 + 20\%$ war. Mit frischem TEMG wurde auf $V_1 + 50\%$ aufgefüllt.

Bei dieser Prozedur wurden die Schwebstoffe ("Fines") entfernt.

Nicht notwendig war die bis jetzt beschriebene Vorbehandlung für die bereits vorgequollene DEAE-Cellulose DE 52. Dieses Material wurde lediglich in Puffer (TEMG) aufgenommen.

Die Chromatographiesäule wurde, unter Vermeidung von Konvektionen, mit der vorbereiteten Cellulose gefüllt. Dann wurde solange TEMG-Puffer durchgepumpt (Geschwindigkeit $45 \text{ ml pro Stunde und cm}^2$), bis die Höhe des Säulenbettes konstant blieb.

Die Probe wurde aufgetragen (30 ml / h x cm^2), mit TEMG gewaschen (2 Säulenvolumina) und mit einem Gradienten von 0 bis $0,8 \text{ mol/l KCl}$ in TEMG eluiert (45 ml / h x cm^2). Vor dem nächsten Säulenschritt wurden die Proben gegen TEMG dialysiert.

Nach dem Auftragen, Waschen und Eluieren wurde zum Regenerieren des Säulenmaterials Puffer mit hoher Salzkonzentration (z.B. $1,5 \text{ mol/l KCl}$) durchgepumpt (1 - 2 Säulenvolumen) und mit Puffer ohne Salz gewaschen, bis der Durchlauf gleiches pH und gleiche Ionenstärke hatte wie der reine Puffer. Die Ionenstärke wurde dabei gemessen mit einem Konduktivimeter mit Durchflußküvette der Firma Radiometer,

Kopenhagen.

Zum längeren Aufbewahren von vorbehandeltem Säulenmaterial in Puffer wurden 0,03 % Toluol zugesetzt.

3.3.2 DNA - Cellulose

Anleitungen zur Affinitätschromatographie wurden entnommen aus: Tiselius A. et al. (1956), Cuatrecasas P. (1970), Alberts B. & Herrick G. (1971), Cuatrecasas P. & Anfinsen C.B. (1971), Lowe C.R. & Dean P.D.G. (1974) und Thompson S. et al. (1975).

1 g Cellulose (Cellex 410) wurde langsam in 3 ml TEM-Puffer + 1 mg/ml DNA eingerührt. Hierbei ergab sich eine dicke Paste, welche im Luftstrom bei 25° C getrocknet wurde.

Die trockene Paste wurde im Mörser pulverisiert und im Vakuum nachgetrocknet. Anschließend wurden 2 Liter TEM pro 100 g trockener DNA-Cellulose zugegeben und über Nacht bei 4° C stehen gelassen.

Der Überstand wurde abgossen, das Pellet bei 500 g abzentrifugiert und zweimal mit je 500 ml TEM gewaschen. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt bei 260 nm. Dabei entspricht eine Extinktion von 0,024 einer Konzentration von 1 µg DNA / ml Lösung. Die DNA-Konzentration lag hier bei 0,4 - 0,5 mg pro ml DNA-Cellulose.

Die Aufbewahrung erfolgte in TEM + 0,15 mol/l KCl bei -20° C.

Nach dem Auftauen wurde die DNA-Cellulose in 10 V.T. TEM + 0,15 mol/l KCl resuspendiert, in die Säule gegossen und mit TEMG-Puffer äquilibriert.

Bei einer Durchflußrate von bis zu 1 ml/min reichte 1 mg an Cellulose gebundene DNA für 2 mg Polymerase.

Nach dem Auftragen der Probe wurde mit TEMG + 0,15 mol/l KCl gewaschen, bis die optische Dichte (gemessen bei 280 nm) des Durchlaufs $< 0,05$ war. Eluiert wurde mit einem KCl-Gradienten von 0,15 bis 1,0 mol/l in TEMG, wobei an DNA gebundene Proteine bei etwa 0,65 mol/l KCl gelöst wurden (nach Bautz E.K.F., 1972).

3.3.3 "Affi-Gel Blue"

"Affi-Gel Blue" ist ein sehr effektives Material für Affinitäts-Chromatographie. Dabei ist Cibacron Blue F3GA (Warenzeichen der Firma Bio-Rad, Richmond, Kalifornien), ein hochreaktiver blauer Farbstoff, an Agarose gebunden. "Affi-Gel Blue" hat eine biospezifische Affinität zu Nukleotid-bindenden Enzymen (Bio-Rad Katalog E, 1979; Brissac C. et al., 1976; Wilson J.E., 1976).

Da "Affi-Gel Blue" in gebrauchsfertiger Form geliefert wurde, entfiel jede Vorbehandlung. Die Säule wurde direkt damit gefüllt.

Die Aufbewahrung konnte bei Raumtemperatur erfolgen, da das Material Natriumazid (0,02 %) enthielt.

Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 2 Säulenvolumina

TEMG gewaschen und mit einem Gradienten von 0 bis 1,5 mol/l KCl in TEMG eluiert.

3.4 Standardreaktionsansätze zur Messung der DNA - Polymerase - Aktivitäten

Diese Ansätze wurden variiert nach Joester W. et al. (1978) und Weinstein B.I. et al. (1975).

3.4.1 DNA - Polymerasen A und B

Folgender Standardreaktionsansatz zur Messung der Aktivitäten von DNA-Polymerase A und B kam zur Verwendung:

Tris-HCl, pH 8,0	50 mmol/l
β -Mercaptoäthanol	2 mmol/l
KCl	40 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
BSA	10 μ g/ml
aktivierte Kalbsthymus-DNA	100 μ g/ml
dATP, dCTP, dGTP	je 0,1 mmol/l
dTTP	50 μ mol/l
³ H-dTTP	10 μ Ci/ml

Pro Test wurden 200 μ l dieses Ansatzes + 50 μ l Enzymlösung (1:1 mit Wasser verdünnt), d.h. insgesamt 250 μ l eingesetzt.

Inkubation erfolgte in der Regel für 2 Stunden bei 20° C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen.

3.4.2 DNA - Polymerase C

(die "dritte Aktivität")

Ein ähnlicher Ansatz wie oben diente zur Aktivitätsbestimmung der DNA-Polymerase C:

Tris-HCl, pH 8,0	25 mmol/l
β -Mercaptoäthanol	1 mmol/l
KCl	5 mmol/l
MnCl ₂	1 mmol/l
BSA	0,4 mg/ml
Template/Primer	ca. 20 ug/ml
dGTP bzw. dTTP	0,05 mmol/l
³ H-dGTP bzw. ³ H-dTTP	100 uCi/ml

Pro Test wurden 50 ul des Ansatzes mit 50 ul Enzymlösung (1:1 mit Wasser verdünnt) gemischt. Inkubiert wurde 2 Stunden bei 20° C.

3.5 Radioaktivitätsmessungen

Die inkubierten Proben wurden mit 10 % TCA + 0,1 % PP + 10 mg/l DNA (als Carrier) gefällt und nach wenigstens 30 Minuten im Eisbad über Membranfilter abgesaugt. Es folgte dreimaliges Waschen mit 5 % TCA + 0,1 % PP, Trocknen der Filter (30 min bei 120° C) und Zählen der Radioaktivität in je 5 ml Scintillationsflüssigkeit in einem Nuclear Chicago Mark II Liquid Scintillation Counter, mit einer Zählzählbeute von 62 % für Tritium.

3.6 Bestimmung des Einbaus von dNMP

Um aus den gezählten radioaktiven Impulsen pro Minute den Einbau des entsprechenden Mononukleotides in den neu synthetisierten DNA-Strang angeben zu können, mußten mehrere Faktoren berücksichtigt werden:

- (1) die im Test eingesetzten uCi markierten Triphosphates (*NTP) = A;
- (2) dessen spezifische Aktivität (Ci/mmol) = B;
- (3) die Zählausbeute des Meßgerätes (cpm/uCi) = C;
- (4) die Konzentration (umol/ul) desjenigen nicht markierten Triphosphates, das auch markiert vorliegt = D;
- (5) die Anzahl (1 bis 4), wieviele verschiedene nicht markierte Triphosphate eingesetzt wurden = E;
- (6) das Reaktionsvolumen (ul) = F.

Daraus ergibt sich die Formel (2):

$$P = \frac{A \times C}{D \times E \times F + \frac{A}{B} \times 1000} \quad (2)$$

wobei P die gezählten Impulse pro Minute (cpm) pro pmol eingebautem NMP darstellt.

In den Standardreaktionsansätzen ergab sich dabei:

Template: Kalbsthymus-DNA poly(rA)(dT)

A	2 uCi	5 uCi
B	30 Ci/mmol	30 Ci/mmol
C	620.000 cpm/uCi	620.000 cpm/uCi
D	5 umol/ul	50 umol/ul
E	4	1
F	250 ul	100 ul
P	245 cpm/pmol	600 cpm/pmol

3.7 Aktivierung von Kalbsthymus - DNA

Da native DNA als Template für DNA-Polymerasen nicht sehr effektiv ist (Aposhian H.V. & Kornberg A., 1962), wurde sie durch teilweisen DNase-Verdau aktiviert.

Diese Aktivierung von Kalbsthymus-DNA erfolgte hier nach der Methode von Aposhian H.V. & Kornberg A. (1962).

In einem Vortest wurde zunächst die optimale Inkubationszeit für den Verdau ermittelt:

10,0 ml	DNA (2 mg/ml)
0,25 ml	Tris-HCl, pH 7,5 (0,5 mol/l)
0,08 ml	KCl (3 mol/l)
0,06 ml	MgCl ₂ (1 mol/l)
0,11 ml	DNase (1,309 ug/ml in 1 mg/ml BSA-Lösung)
ad 12,48 ml	H ₂ O

Während der Inkubation bei 37° C erfolgten die Probenentnahmen zu den Zeiten 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden.

Es wurde jeweils 1 ml entnommen, mit 250 μ l 5 mol/l NaCl vermischt, 10 min bei 60° C inaktiviert und im Eisbad aufbewahrt.

Mit diesen Proben wurde der Standardtest auf DNA-Polymerase-Aktivität durchgeführt. Hierbei wurde eine Enzymfraktion mit bekannter Aktivität eingesetzt.

Die optimale Inkubationszeit betrug in der Regel 2 Stunden. Ein größerer Ansatz DNA wurde dann entsprechend aktiviert und portionsweise bei -20° C eingefroren und gelagert.

3.8 Proteinteste

3.8.1 Nach der Methode von Lowry et al. (1951)

Benötigt wurden folgende Lösungen, die bei 4° C aufbewahrt wurden:

1. Lösung A: 4 g NaOH
 20 g Na_2CO_3
 0,2 g K-Na-Tartrat
 ad 1000 ml H_2O

2. Lösung B: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
ad 100 ml H_2O

3. Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz

Vor Gebrauch wurden 12,25 ml Lösung A mit 0,25 ml Lösung B vermischt. Davon wurde 1 ml pro Test eingesetzt, zu dem 0,1 ml Proteinprobe gefügt wurden.

Es wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 0,1 ml Folin-Reagenz (1:1 mit Wasser verdünnt) zugegeben und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messung erfolgte bei 750 nm in einem Beckman Spektralphotometer gegen eine Blindprobe (Wasser statt Protein).

In einer Eichkurve, die mit verschiedenen Mengen BSA erstellt worden war, konnte dann aus der Extinktion direkt der Proteingehalt abgelesen werden. Der Meßbereich liegt bei 20 - 150 μg Protein/ml.

3.8.2 Nach der Methode von Schaffner & Weissmann (1973)

Weitaus empfindlicher und genauer ist die Proteinmessung nach Schaffner & Weissmann (1973). Dazu wurden diese Lösungen benötigt:

Lösung 1: 1 mol/l Tris-HCl, pH 7,5
1 % SDS

Lösung 2: (Färbelösung)
0,1 % Amidoschwarz 10 B in

Methanol / Eisessig / Wasser (45:10:45 V.T.)

Lösung 3: (Entfärbelösung)

Methanol / Eisessig / Wasser (90:2:8 V.T.)

Lösung 4: (Elutionspuffer)

25,0 mmol/l NaOH

0,05 mmol/l EDTA

in 50 %igem Äthanol

Die proteinhaltige Probe wurde mit Wasser auf 270 μ l verdünnt, mit 30 μ l Lösung 1 und 60 μ l 100%iger TCA gut vermischt und 2 min bei 20° C inkubiert.

Die Probe wurde dann mit einer Pasteurpipette in die Mitte eines Membranfilters aufgetropft. Nachgewaschen wurde mit 10%iger TCA.

Die Filter kamen für 2 min 25 sec zum Färben in Lösung 2. Die anschließende Entfärbung erfolgte für 30 sec in bidest. H₂O, dreimal je 1 min in Entfärbelösung (Nr. 3) und 1 min wieder in bidest. H₂O. Dann wurden sie auf Papiertüchern getrocknet.

Der gefärbte Spot in der Mitte des Filters wurde mit einem Korkbohrer (Durchmesser 8 mm) ausgestochen und in 1 ml Lösung 4 über Nacht bei 4° C gelegt.

Die Lösung wurde dann bei 630 nm gegen eine Blindprobe (Wasser statt Protein) gemessen.

Stets mitgemessen wurden Standardlösungen (15, 30 und

45 ug BSA). Der Proteingehalt wurde aus einer mit BSA erstellten Eichkurve abgelesen.

3.9 Test auf Nuklease - Aktivität

3.9.1 Endonukleasen

Wenn das Enzym Endonukleaseaktivität aufweist, ist es fähig, geschlossen zirkuläre pSF 2124-DNA aufzuschneiden. Bei Gelchromatographie muß dann die Bande, die auf den DNA-Ring zurückzuführen ist, verschwinden. Die in verschieden große lineare Stücke geschnittene pSF 2124-DNA wird dann über das ganze Gel verteilt und nur andeutungsweise zu erkennen sein.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 50 ul:

2 ug	pSF 2124 DNA
50 mmol/l	Tris-HCl, pH 8,2
10 mmol/l	β -Mercaptoäthanol
5 mmol/l	MgCl ₂
20 ul	Enzymlösung

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37° C wurden je 10 ul einer Lösung von 2% SDS, 0,05% Bromphenolblau und 50% Sucrose zugegeben und die Proben auf 0,7%igen Agarosegelen elektrophoretisch auf Anwesenheit von Endonukleaseaktivität geprüft (vgl. 3.10).

3.9.2 Exonukleasen

Exonukleaseaktivität wurde nachgewiesen durch Freisetzung säurelöslicher ^3H -Radioaktivität aus tritierter E. coli-DNA nach der Methode von Richardson C.C. et al. (1964).

Im Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 300 μl) waren enthalten:

50 mmol/l	Tris-HCl, pH 8,0
10 mmol/l	β -Mercaptoäthanol
5 mmol/l	MgCl_2
10 μg	^3H -DNA (4000 cpm/ μg)
50 μl	Enzymlösung

Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden 100 μl Kalbsthymus-DNA (1 mg/ml) und 250 μl 10%ige TCA zugegeben und die Proben 30 min in Eis gestellt.

Das TCA-Präzipitat wurde in einem Sorvall SS 34-Rotor bei 20.000 rpm 20 min abzentrifugiert. Die Radioaktivität im Überstand wurde in 300 μl -Aliquots in je 10 ml Aquasol gemessen.

3.10 Agarose - Gelelektrophorese

Verwendet wurden 0,7 %ige Agarosegele (= 0,7 g Agarose in 100 ml Elektrophoresepuffer + 10 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid).

Der Elektrophoresepuffer enthielt:

0,04 mol/l Tris-HCl, pH 7,6

0,02 mol/l Natriumazetat

2,0 mmol/l EDTA

Die Elektrophorese lief ab bei 8 mA pro Gel, ca. 3 Stunden. Dem Puffer im unteren Behälter (Anodenpuffer) war noch 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

Die Banden waren unter UV-Licht sichtbar und wurden mit Polaroidfilm aufgenommen.

3.11 Glyzeringradienten

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der DNA-Polymerase wurden ca. 100 µl Enzymlösung auf einen 10 - 30%igen Glyzeringradienten in TEM + 0,5 mol/l KCl aufgetragen.

Die Zentrifugation erfolgte 17 Stunden bei 200.000 g (4° C).

Die Röhrchen wurden in Fraktionen zu etwa 0,5 ml ausgetropft und auf Polymeraseaktivität getestet.

Zum Vergleich wurden Röhrchen mitzentrifugiert, die als Probe 50 µl einer Lösung von je 3 mg/ml Aldolase, BSA und Katalase enthielten.

3.12 Immunisierung und Gewinnung von Antiserum

Jeweils 1 ml Enzymlösung wurde mit 1 ml Freund'schem

Adjuvans komplett in einer sterilen Spritze homogen vermischt und subcutan "Holländer"-Kaninchen gespritzt. Diese Impfung wurde viermal im Abstand von jeweils einer Woche wiederholt (Clausen J., 1971; Günther O., 1979).

Vor der ersten Impfung wurden den Kaninchen mit einer Saugglocke aus der Ohrvene je 10 ml Blut entnommen, aus dem dann das Kontrollserum gewonnen wurde.

Dazu blieben die Röhrchen mit dem Blut etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Das Koagulat wurde abgekratzt und die Proben kamen über Nacht in den Kühlraum.

Danach wurde das Serum dreimal je 30 min bei 1000 g abzentrifugiert und dekantiert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 30 min bei 25.000 g wurde der Überstand portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach der letzten Impfung wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet und daraus wie oben beschrieben die Seren gewonnen und in LN_2 eingefroren.

3.13 Reinigung von IgG

Das Antiserum wurde in der Kälte tropfenweise unter Rühren mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Nachdem es dann noch eine Stunde ohne zu Rühren stand, wurde das Pellet abzentrifugiert (15 min, 1000 g), in 1/3 des Ausgangsvolumens 5 mmol/l Phosphatpuffer, pH 8,0, aufgenommen und gegen den gleichen Puffer

dialysiert.

Ein eventuell erscheinender Niederschlag wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (DE 52) aufgetragen und mit 5 mmol/l Phosphatpuffer, pH = 8,0, gewaschen.

Das IgG, welches unter diesen Bedingungen im Gegensatz zu den anderen Serumproteinen nicht gebunden wurde, war im Durchlauf enthalten. Es konnte als Peak bei 280 nm gemessen werden.

Bei Bedarf wurde die IgG-Lösung nochmals konzentriert (Ammoniumsulfatfällung oder Amiconfiltration und anschließende Dialyse). Verwendet wurden hier in der Regel Lösungen mit 10 mg/ml IgG.

3.14 Test auf Reaktion der Enzymaktivität mit IgG

Das wie oben beschrieben gewonnene und gereinigte IgG wurde in folgendem Ansatz (50 µl Endvolumen) mit den DNA-Polymerasen zur Reaktion gebracht:

10 mmol/l	Tris-HCl, pH 8,0
20 mmol/l	KCl
5 µg	BSA
14 %	Glyzerin
50 µg	reines IgG
20 µl	Enzymlösung

Es folgte eine Inkubation von 15 min bei 37° C, Auffüllen der Proben zum Standardreaktionsansatz und Messung der Polymeraseaktivitäten.

Hierzu wurden die nachstehenden Mengen bzw. Volumina benötigt:

Template:	poly(rA)(dT) Kalbsthymus-DNA	

Tris-HCl, pH 8,0 (250 mmol/l)		
+ β -Mercaptoäth. (10 mmol/l)	8 ul	48 ul
KCl (1 mol/l)	-	5 ul
MnCl ₂ (20 mmol/l)	5 ul	-
MgCl ₂ (250 mmol/l)	-	5 ul
poly(rA)(dT) (5 OD/ml)	10 ul	-
KT-DNA (2 mg/ml)	-	10 ul
dATP, dCTP, dGTP (je 10 mmol/l)	-	je 2 ul
dTTP (10 mmol/l)	0,5 ul	0,5 ul
3H-dTTP (1 mCi/ml)	5 ul	2 ul
H ₂ O	ad 100 ul	ad 250 ul

3.15 Methoden zur Konzentrierung der DNA - Polymerase - Fraktionen

3.15.1 Konzentrierung in PEG 6000

Eine Probe der zu konzentrierenden Fraktionen wurde in Dialyseschläuche gefüllt und in eine 30 %ige Lösung von

PEG 6000 gelegt, welche ständig gerührt wurde. Nach etwa 15 Stunden waren die Proben auf knapp 1/10 des ursprünglichen Volumens eingeeengt und wurden gegen TEMG ausdialysiert.

3.15.2 Säurefällung

100 ml der Polymerase enthaltenden Fraktionen wurden mit HCl langsam auf pH-Werte von 4,0 bis 3,0 eingestellt, 30 min gerührt und das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert.

Der Niederschlag wurde in TEMG aufgenommen und auf pH 8,2 gebracht.

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde eine Probe stufenweise mit HCl auf pH-Werte von 4,0 bis 3,0 eingestellt. Jedesmal wurde abzentrifugiert und vom Überstand ein Aliquot zum Testen auf Enzymaktivität entnommen.

3.15.3 Alkoholfällung

10 ml Probe wurden tropfenweise mit reinem, auf -20°C gekühlten absoluten Äthanol bei 0°C bis zu einer Konzentration von 40 % versetzt und über Nacht bei -20°C aufbewahrt. Das dann abzentrifugierte Präzipitat wurde in 1 ml TEMG aufgenommen.

3.15.4 Amicon - Filtration

Die Enzymlösung wurde in einem Amicon-Filtrationsgerät durch eine Amicon Diaflo Ultrafiltrationsmembran Typ UM 10 gedrückt (anfangs waren 1,6 bar, nach etwa 1/4 des Volumens

über 3 bar notwendig) und so von 100 ml auf 15 ml eingeengt (Blatt W.F., 1971).

Die Aktivität wurde im Durchlauf und in der eingeengten Lösung gemessen.

3.15.5 Affinitätschromatographie an "Affi-Gel Blue"

Eine Säule (1 cm Durchmesser, 10 cm Höhe) wurde mit "Affi-Gel Blue" gefüllt, mit der Probe beladen, mit TEMG gewaschen und mit einem Gradienten von 0 bis 1,5 mol/l KCl in TEMG eluiert.

Fractionen zu 1 ml wurden gesammelt und auf Polymerase-Aktivität getestet.

3.15.6 Fällung mit Ammoniumsulfat

Die Fällung mit Ammoniumsulfat geschah durch langsames Zutropfen gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 1,8 mol/l.

Bei verschiedenen Konzentrationen wurde abzentrifugiert, ein Aliquot des Überstandes entnommen und das Sediment in TEMG resuspendiert. Nach Dialyse gegen TEMG wurde auf DNA-Polymerase-Aktivität geprüft.

3.15.7 Konzentrierung im "batch"-Verfahren mit DEAE - Cellulose

Eine 100 ml-Portion der DNA-Polymerase enthaltenden Fractionen wurde auf eine mit DE 23 gefüllte Säule aufgetragen, welche anschließend mit TEMG gewaschen wurde,

bis im Durchlauf kein Protein mehr meßbar war (bei 280 nm).

Die Cellulose wurde aus der Säule herausgespült und in 50 ml 2 mol/l KCl in TEMG 30 min lang gerührt, um die gebundenen Polymerasen wieder in Lösung zu bringen.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand ausdialysiert und auf Aktivität überprüft.

4. ERGEBNISSE

4.1 Entdeckung der poly(rA)(dT) abhängigen Polymerase-Aktivität und deren Trennung von den DNA-Polymerasen A und B

4.1.1 Entwicklung einer schnellen Aufarbeitungsmethode für *Neurospora crassa* Hyphen

Nachdem von Joester W. und Joester K.-E. (persönliche Mitteilungen) Hinweise auf das Vorhandensein einer dritten DNA-Polymerase-Aktivität gefunden worden waren, sollte diesen Spuren nachgegangen werden.

Da diese Aktivität nur in geringsten Mengen vorlag, war es zunächst notwendig, eine Methode zu entwickeln, große Ausgangsmengen Hyphen möglichst schnell und doch schonend aufzuschließen. Erst dann würde diese Aktivität in ausreichender Menge isoliert und analysiert werden können.

So wurde die Aufarbeitungsmethode entwickelt, wie sie im Teil Methoden (s. 3.2) beschrieben ist.

Da bei diesem Vorgehen die sonst üblichen Schritte wie z.B. Zerreiben mit Glasperlen oder Sand, Homogenisieren von Hand im Glaspotter, Ultraschall, Gradientenzentrifugation, o.ä., bei denen in zeitraubenden Prozeduren stets

nur kleine Volumina eingesetzt werden können, entfielen, konnten damit schließlich Mengen bis zu 5 kg (Feuchtgewicht) *Neurospora crassa* Hyphen in einem Arbeitsgang aufgearbeitet werden.

Einen Überblick gibt Abbildung 3:

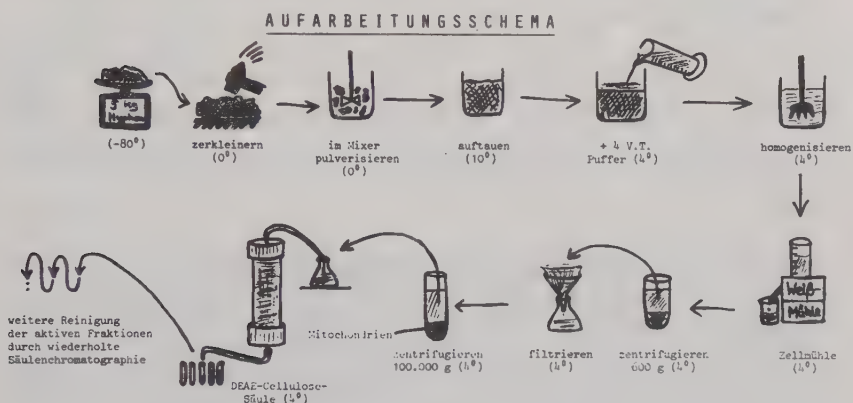


Abbildung 3: Aufarbeitungsmethode für *Neurospora crassa* Hyphen

4.1.2 Trennung und erste Reinigung von drei DNA-Polymerasen

Aufgrund der Ergebnisse von Joester K.E. et al. (persönliche Mitteilungen) konnte davon ausgegangen werden, daß neben den beiden isolierten DNA-Polymerasen A und B bei der Elution von einer DEAE-Cellulose-Säule noch eine weitere DNA-Polymerase-Aktivität bei höherer Salzkonzentration nachzuweisen ist, allerdings in sehr viel geringerer Quantität.

Es war jedoch unbekannt, ob diese dritte Aktivität mit

einer der beiden Polymerasen A oder B verwandt war, z.B. ein Vorläuferprotein oder ein Aggregat, vielleicht auch aus beiden, oder aber ob sie ein eigenes Enzym darstellte.

Da die Polymerasen A und B nachgewiesenermaßen Eigenschaften aufweisen wie die α - und γ -Polymerasen höherer Eukaryoten (Joester W. et al., 1978), ließe sich, wenn es sich bei der dritten Aktivität um ein nichtverwandtes Protein handelte, der Schluß ziehen, daß dieses Enzym gleiche oder ähnliche Eigenschaften haben sollte wie β -Polymerasen.

Die β -Polymerasen höherer Eukaryoten zeigen mit KT-DNA als Template im Gegensatz zur α - und γ -Polymerase sehr viel geringere Aktivität, als mit dem synthetischen Template poly(rA)(dT) - (Bollum F.J., 1975; Holmes A.M. & Johnston I.R., 1975; Weissbach A., 1975; Weissbach A., et al., 1975; Weissbach A., 1977; Sarndgadhara M.G., et al., 1978).

Falls die dritte DNA-Polymerase-Aktivität in *Neurospora crassa*, die nur schwer zu finden war, tatsächlich eine β -ähnliche Polymerase darstellt, müßte sie bei Einsatz von poly(rA)(dT) als Template leichter nachzuweisen sein.

Bei einem Vorversuch wurde ein Teil des Überstandes von der Zentrifugation bei 100.000 g (ca. 100 ml von insgesamt knapp 20 l) auf eine Chromatographiesäule mit DEAE-Cellulose aufgetragen. Nach dem Waschen mit 2 Säulenvolumina TEMG wurde mit einem sehr flachen Gradienten (6 Säulenvolumina) von 0 bis 0,8 mol/l KCl in TEMG eluiert. Die gesammelten

Fractionen wurden auf Polymerase-Aktivität getestet.

Mit aktivierter Kalbsthymus-DNA (KT-DNA) als Template zeigten sich zwei deutliche Maxima. Bei 0,6 mol/l KCl trat noch ein weiterer, sehr kleiner Aktivitäts-Anstieg auf.

Die Fractionen wurden daraufhin mit dem synthetischen Template/Primer poly(rA)(dT) geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die ersten beiden, deutlichen, Maxima nahezu keine Aktivität damit zeigten. Der dritte, kleine, Gipfel jedoch ließ ein klares Aktivitätsmaximum mit diesem Template erkennen.

Damit war jetzt die Möglichkeit gegeben, die dritte Aktivität sensitiver nachzuweisen und damit auch zu isolieren. Durch das unterschiedliche Verhalten mit den Templates wurde auch die Annahme bestärkt, daß es sich dabei um ein eigenes Enzym handelt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese dritte Aktivität nunmehr als "DNA-Polymerase C" bezeichnet.

In allen weiteren Elutionen wurde deshalb dann stets sowohl mit aktivierter Kalbsthymus-DNA, als auch mit poly(rA)(dT) als Template/Primer auf DNA-Polymerase-Aktivitäten getestet.

Die Hauptmenge des Überstandes von der Zentrifugation bei 100.000 g (ca. 20 Liter bei einer Ausgangsmenge von 5 kg Hyphen) wurde auf eine große Säule aufgepumpt und nach dem Waschen mit einem KCl-Gradienten eluiert.

Die Abbildung 4 zeigt das Elutionsprofil.

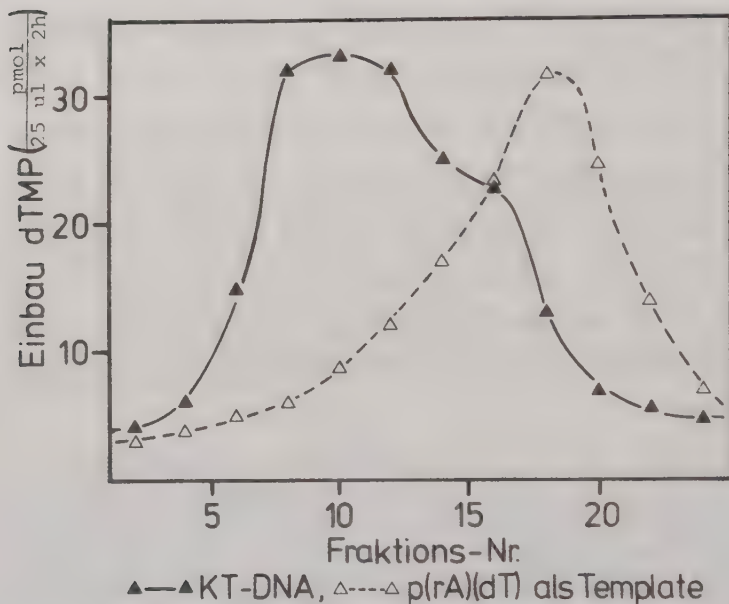


Abbildung 4: Elution von der ersten DE 23-Säule (DE 23-I). Die Vorbehandlung der Säule (Durchmesser 15 cm, Höhe 80 cm, 12 l DEAE-Cellulose DE 23) und das Auftragen der Probe erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Gewaschen wurde mit 40 l TEMG und eluiert mit 20 l eines KCl-Gradienten (0 - 1,0 mol/l KCl in TEMG). Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 750 ml gesammelt. Der Einbau dTMP wurde im Standardtest (s. 3.4) gemessen.

Man erkennt ein breites Maximum mit einer Schulter bei KT-DNA als Template, sowie, deutlich davon getrennt, ein Aktivitätsmaximum mit poly(rA)(dT).

Alle Fraktionen, die mit einem der beiden Templates DNA-Polymerase-Aktivität zeigten, wurden vereinigt. Im einzelnen waren das die Fraktionen Nr. 7 mit 13 und Nr. 16 mit 20. Dabei ergaben sich etwa 9 Liter.

Da die Polymerasen A und B zu Vergleichszwecken auch weiter gereinigt werden sollten, erfolgte die Abtrennung dieser beiden von der "C"-Aktivität erst später.

Diese vereinigten Fraktionen wurden auf eine zweite DE 23-Säule aufgetragen, mit TEMG gewaschen und mit einem KCl-Gradienten eluiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 ersichtlich.

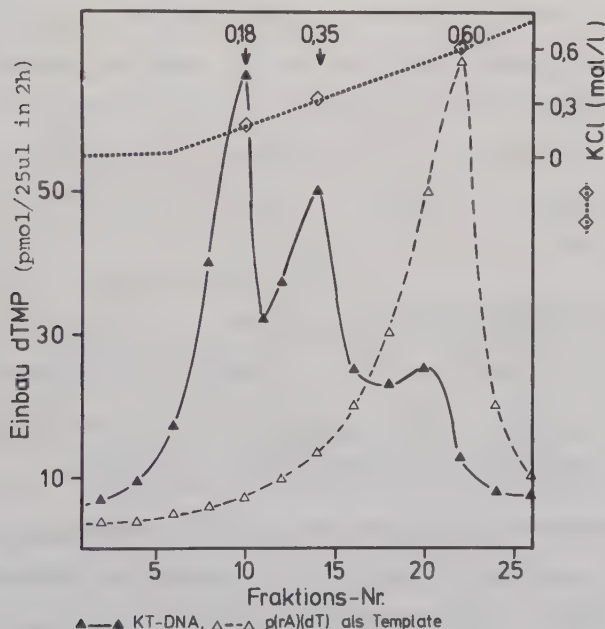


Abbildung 5: Elution von der zweiten DE 23-Säule (DE 23-II). Verwendet wurde eine Säule von 12 cm Durchmesser und 60 cm Höhe, gefüllt mit 6 l DEAE-Cellulose DE 23, vorbehandelt wie unter 3.3.1 beschrieben. Nach dem Waschen mit 12 l TEMG wurde mit einem KCl-Gradienten (0 - 0,8 mol/l KCl in TEMG; 18 l) eluiert. Fraktionen zu je 600 ml wurden gesammelt. Der Einbau dTMP wurde im Standardtest gemessen (s. 3.4).

Zwei gut getrennte hohe Maxima mit KT-DNA als Template

stellen die DNA-Polymerasen A und B dar. Sie eluieren, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Joester et al. (1978) bei ca. 0,18 und 0,35 mol/l KCl.

Ein drittes, kleineres Maximum fällt mit dem Aktivitätsmaximum mit poly(rA)(dT) als Template zusammen und liegt bei 0,60 mol/l KCl.

Von den Fraktionen, welche die Polymerase-"C"-Aktivität enthielten (Nr. 19 mit 22), wurden 300 ml abgenommen, um eine erste Charakterisierung des C-Enzymes vorzunehmen. Die verbliebenen 2100 ml wurden mit den Fraktionen vereinigt, welche die Polymerasen A und B enthielten (Nr. 8 mit 14). Die erhaltenen 6,3 Liter wurden vorerst bei -80°C eingefroren.

4.1.3 Templateabhängigkeit

Die ersten Versuche mit der grob isolierten DNA-Polymerase "C" waren darauf ausgerichtet, festzustellen, mit welchen Templates die besten Reaktionen ablaufen.

Eingesetzt wurden die synthetischen RNA-Templates (mit Primer) poly(rA)(dT), poly(rC)(dG), sowie poly(mC)(dG) mit methyliertem Cytosin, welches größere Stabilität gegen RNasen zeigt. Sodann wurden die synthetischen DNA-Templates poly(dA)(dT), mit Primer, und oligo(dT), ohne Primer, getestet. Ebenfalls geprüft wurde die Effektivität von aktivierter Kalbsthymus-DNA (KT-DNA). Das Ergebnis zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV. TEMPLATE ABHÄNGIGKEIT DER DNA-POLYMERASE C

Template	Einbau dNMP / 25 μ l in 2 ^h	
	cpm	pmol
p(rA)(dT)	110 000	200
p(dA)(dT)	21 000	35
p(rC)(dG)	800	1
p(mC)(dG)	1 000	1,5
oligo(dT)	1 200	2
KT-DNA * / Mg ²⁺	11 000	44
KT-DNA * / Mn ²⁺	4 100	16

* aktivierte Kalbsthymus-DNA

Die Messungen wurden im Standardtest durchgeführt (s.3.4.2), mit den verschiedenen Templates anstelle des poly(rA)(dT) (in gleicher Konzentration).

Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß poly(rA)(dT) das beste Template ist. Mit poly(rC)(dG) und poly(mC)(dG) sind nur sehr niedrige Einbauwerte zu messen, sie werden also als Template nicht angenommen.

Daß mit oligo(dT) ohne Primer auch praktisch kein Einbau von dNMP zu sehen ist, kann als Beweis dienen, daß es sich bei diesem Enzym nicht um eines mit Eigenschaften einer Terminalen Transferase handelt, sondern um eine echte DNA-Polymerase, die zum Synthetisieren eines neuen Stranges ein Template und einen Primer benötigt. Terminale Trans-

ferasen dagegen hängen an einen bestehenden Einzelstrang beliebige Nukleotide an, ohne einen zweiten Strang als Template zu verwenden, verlängern also unspezifisch. Eine biologische Bedeutung dieses Enzyms ist unbekannt (Bollum F.J., et al., 1974).

Bereits aus der Elution von der zweiten Säule war bekannt, daß die Polymerase "C" mit aktivierter Kalbsthymus-DNA im Test mit Mg^{2+} eine gewisse Aktivität zeigt. Mit Mn^{2+} als divalentem Kation zeigt sich jedoch sehr viel geringerer Einbau, was mit den Ergebnissen übereinstimmt, die bei β -Polymerasen höherer Eukaryoten gefunden wurden (Bollum F.J., et al., 1974). Auch die β -Polymerase zeigt bei poly(rA)(dT) als Template mit Mn^{2+} und bei KT-DNA als Template mit Mg^{2+} höhere Aktivität.

4.1.4 Test auf endogene Reaktion

Dieser Test diente dazu, festzustellen, ob die DNA-Polymerase-Aktivität tatsächlich von dem zugegebenen Template abhängig ist, oder ob vielleicht eine in der Enzymlösung bereits vorhandene Matrize das nur vortäuscht.

Zum Messen diente der Standardreaktionsansatz (s. 3.4), einmal mit poly(rA)(dT) als Template, zum anderen ohne diese Zugabe. Die Tabelle V zeigt das Ergebnis.

Tabelle V. ENDOGENE AKTIVITÄT

	Einbau dNMP / 25 ul in 2 ^h	
	cpm	pmol
mit p(rA)(dT) als Template	109 000	180
ohne Templatezugabe = endogen	0	0

Standardreaktionsbedingungen (s. 3.4), mit Zusatz aller vier Desoxynukleotidtriphosphate (je 100 umol/l). Ein Blindwert von 1.100 cpm ist abgezogen.

Mit Templatezugabe (poly(rA)(dT) als Matrize) wurden ca. 180 pmol Einbau dNMP in 2 Stunden bei 25 ul enzymhaltiger Lösung gemessen.

Beim zweiten Test, ohne Templatezugabe, konnte kein Einbau festgestellt werden, sodaß das Vorliegen eines endogenen Templates ausgeschlossen werden kann.

4.1.5 Temperaturabhängigkeit

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die Abhängigkeit der DNA-Polymerase "C" von der Inkubationstemperatur; die Abbildung 8 die der Polymerasen A und B.

Die Enzyme wurden im Standardreaktionsansatz bei verschiedenen Temperaturen (4°, 10°, 20°, 30° und 37° C) bis zu je 20 Stunden inkubiert.

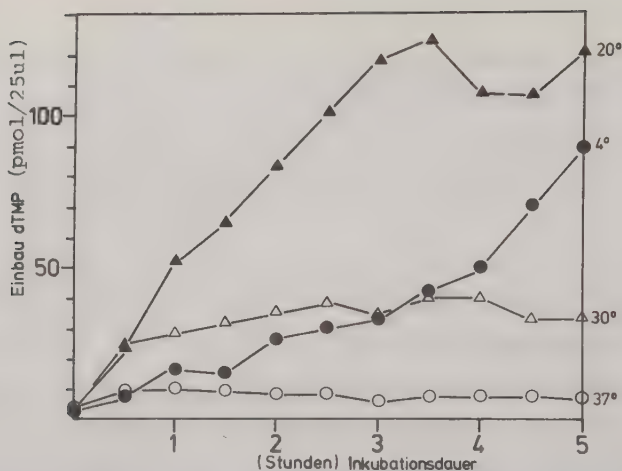


Abbildung 6: Aktivität der DNA-Polymerase C bei verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten von je 0 bis 5 Stunden, gemessen im Standardtest (s. 3.4.2). Die Proben standen in entsprechend temperierten Wasserbädern. Aliquots von 100 ul wurden alle 30 min entnommen, mit TCA gefällt und gemessen (s. 3.5).

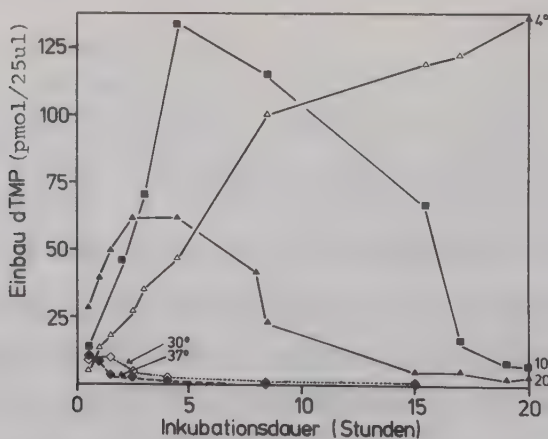


Abbildung 7: Aktivität der DNA-Polymerase C bei verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten von je 0,5 bis 20 Stunden. Gleiche Versuchsdurchführung wie bei Abb. 6, aber über einen Zeitraum von 20 Stunden. Die Probenentnahmen erfolgten in längerem Abstand (in der Abbildung sind alle Werte eingetragen).

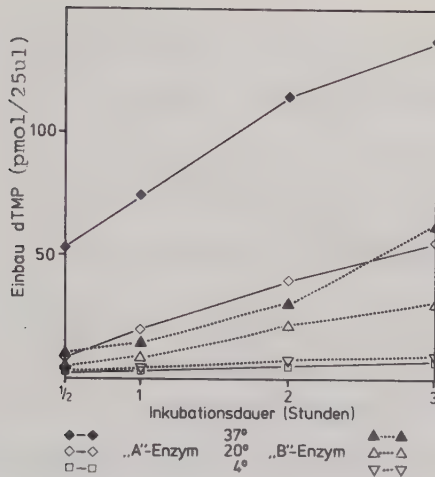


Abbildung 8: Aktivität der DNA-Polymerasen A und B bei verschiedenen Temperaturen und Inkubationszeiten von 0,5 bis 3 Stunden, gemessen im Standardtest (s. 3.4.1). Sonst gleiche Versuchsbedingungen wie bei Abbildung 6. Probenentnahmen alle 60 min.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß bei Inkubationstemperaturen von 30° und 37° C das Aktivitätsmaximum der C-Polymerase etwa nach 1/2 Stunde schon erreicht war und zudem sehr niedrig lag.

Bei 20° und 10° C lag das Maximum sehr viel höher, wurde aber erst nach 2 bis 3 Stunden erreicht. Dabei stieg die Aktivität bei einer Temperatur von 10° C aber langsamer an als bei 20°.

Bei 4° C stieg die Aktivität noch langsamer an. Nach 20 Stunden war kein Erreichen eines Maximums zu erkennen.

Der Abfall der Kurven kann auf einen Abbau des gebildeten Produktes durch Nukleasen zurückgeführt werden. Da Nukleasen unter 20° C in ihrer Wirkung gehemmt werden (Koch J.G., persönliche Mitteilung), ist der bessere und länger

andauernde Einbau, also das spätere Abknicken der Kurven bei niederen Temperaturen damit erklärbar.

Ein Vergleich der Einbauzunahmen bei den verschiedenen Temperaturen in den ersten 2 Stunden zeigt, daß die Polymeraseaktivität bei 20° C am höchsten ist.

Um einen Einbau in einem gut meßbaren Bereich zu erhalten, dabei aber gleichzeitig den Zeitaufwand für die einzelnen Messungen möglichst gering zu halten, wurde eine Inkubation von 2 Stunden bei 20° C gewählt. Diese Versuchsanordnung wurde dann auch bei allen weiteren Experimenten eingehalten.

Anders liegen die Verhältnisse, wie Abbildung 8 erkennen läßt, bei den DNA-Polymerasen A und B.

In diesem über 3 Stunden gelaufenen Versuch war eine deutlich höhere Aktivität zu erreichen mit einer Inkubation bei 37° C. Das trifft sowohl auf das A- wie auf das B-Enzym zu. Der Anstieg bei 20° und 4° war sehr viel geringer. Das zeigt, daß das Temperaturoptimum für diese beiden Polymerasen bei 37° C liegt; im Gegensatz zu dem 20°-Optimum der oben getesteten "C"-Polymeraseaktivität.

Da jedoch bei 20° C der Einbau noch in einem gut meßbaren Bereich lag, wurden, um die Versuchsdurchführungen zu vereinheitlichen, bei allen weiteren Tests die Polymerasen A und B ebenso wie die Polymerase C 2 Stunden bei 20° C inkubiert.

4.1.6 Ionenabhängigkeit

Eukaryotische α - und γ -Polymerasen einerseits und β -Polymerasen andererseits unterscheiden sich in ihrer Abhängigkeit von mono- und divalenten Kationen.

Um die Polymerase "C" eventuell weiter als eigenes Enzym charakterisieren zu können, wurden deren Ionenoptima für Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} , sowie für K^+ , Na^+ und NH_4^+ bestimmt.

Die Abbildungen 9 bis 13 zeigen die Resultate.

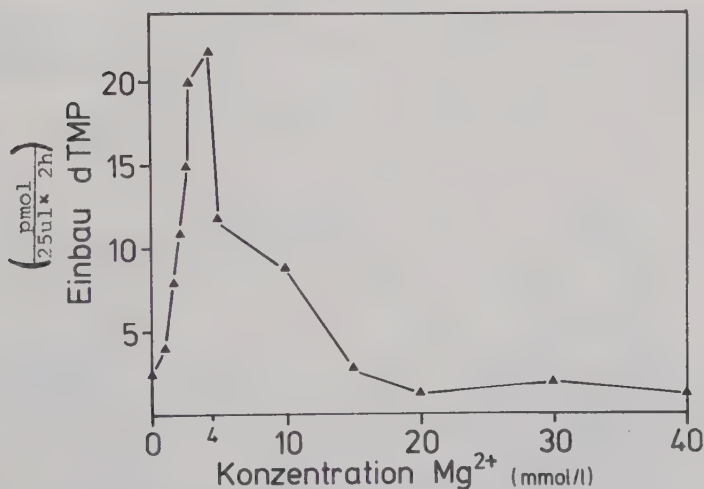


Abbildung 9: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C von Mg^{2+} ; gemessen wurde in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen $MgCl_2$ anstelle des $MnCl_2$.

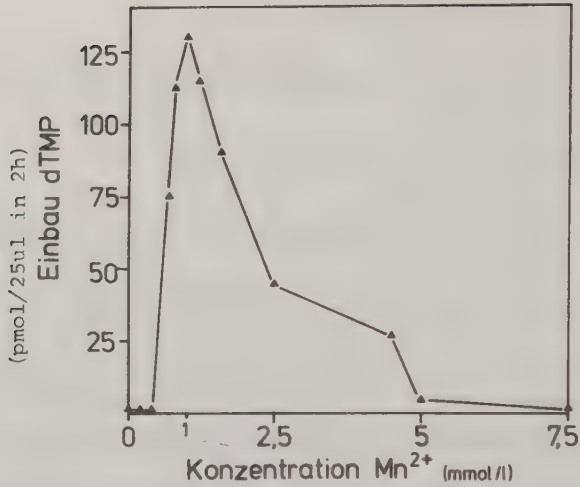


Abbildung 10: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C von Mn^{2+} ; gemessen in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen $MnCl_2$.

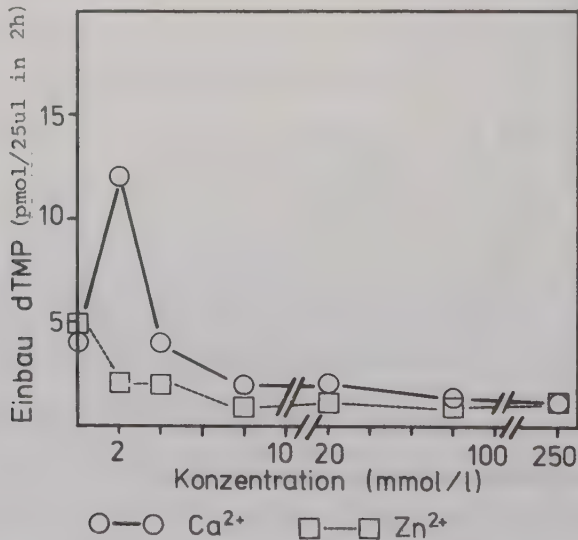


Abbildung 11: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C von Ca^{2+} und Zn^{2+} ; gemessen in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen $CaCl_2$ bzw. $ZnCl_2$ anstelle des $MnCl_2$.

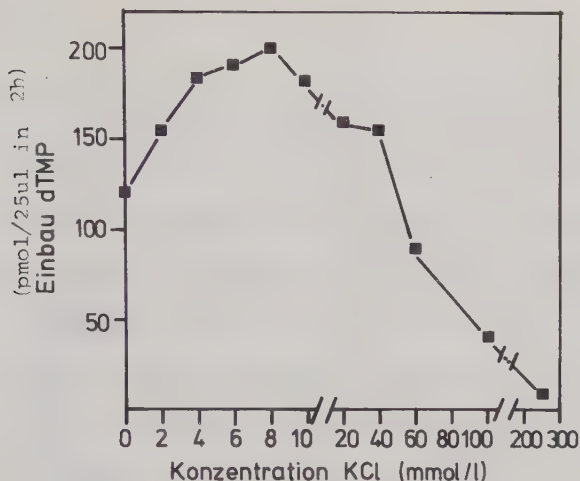


Abbildung 12: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C von K^+ ; gemessen in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen KCl.

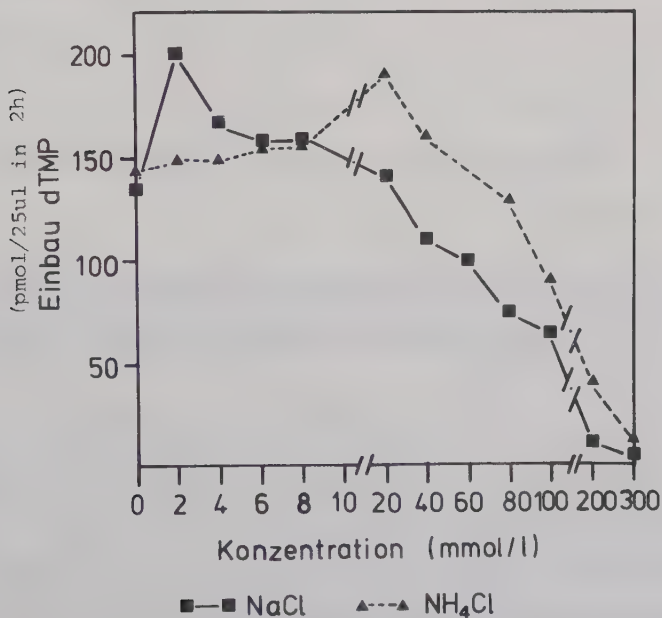


Abbildung 13: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C von Na^+ und NH_4^+ ; gemessen in Standardtests (s. 3.4), mit steigenden Konzentrationen NaCl bzw. NH_4Cl anstelle des KCl.

Aus den Kurven lassen sich diese Ionenoptima angeben:

4 mmol/l Mg^{2+} , 1 mmol/l Mn^{2+} , 2 mmol/l Ca^{2+} ; Zn^{2+} hemmt bereits in einer Konzentration von 2 mmol/l. Insgesamt läßt sich jedoch feststellen, daß als bestes zweiwertiges Kation Mn^{2+} wirkt. Damit liegt die Aktivität, absolut gesehen, mehr als sechsmal so hoch als mit den anderen Ionen.

Für die monovalenten Kationen gelten als Optima:

8 - 10 mmol/l K^+ , 2 mmol/l Na^+ und 20 mmol/l NH_4^+ .

Die von Joester W. et al. (1978) bestimmten Werte für die Ionenoptima der Polymerasen A und B liegen bei 4 mmol/l Mg^{2+} , 2 mmol/l Mn^{2+} mit Präferenz für Mg^{2+} , sowie bei 5 - 70 mmol/l K^+ beim A-Enzym und bei 6 mmol/l Mg^{2+} , 0,8 mmol/l Mn^{2+} , ebenfalls mit Präferenz für Mg^{2+} , sowie bei 45 mmol/l K^+ beim B-Enzym. Damit unterscheiden sich diese Daten deutlich von den oben für das "C"-Enzym bestimmten Werten.

4.1.7 pH-Optimum

Die Bestimmung des pH-Optimums für das "C"-Enzym erfolgte in Standardreaktionsansätzen, in denen der pH-Wert von 4,0 bis 10,5 variiert wurde.

Die Abbildung 14 zeigt ein deutliches Maximum der Aktivität bei pH 8,0. Im Gegensatz dazu liegt bei den Polymerasen A und B das pH-Optimum bei 8,2 (Joester K.-E., Dissertation, in Vorbereitung). Bei diesem Wert zeigt die "C"-Polymerase schon deutlich geringere Aktivität.

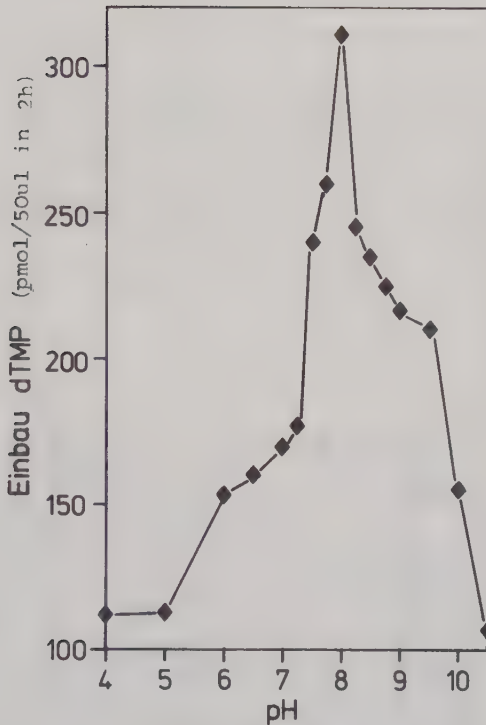


Abbildung 14: Bestimmung des pH-Optimums für die DNA-Polymerase C, gemessen in Standardtests (s. 3.4). Der pH-Wert wurde durch den Tris-HCl-Puffer variiert. Pro Test wurden hier 50 μ l enzymhaltige Lösung eingesetzt.

4.1.8 Abhängigkeit von Hemmstoffen

Es ist bekannt, daß sich die DNA-Polymerasen α , β und γ in ihrer Hemmbarkeit durch bestimmte Stoffe unterscheiden: N-Ethylmaleimid (NEM) hemmt in einer Konzentration von 3 mmol/l α und γ , die β -Polymerase dagegen nicht (Matsukage A. et al., 1975). Dafür ist der Einfluß von para-Chloromercuribenzoat (pCMB) auf alle drei Polymerasen ab einer

Konzentration von 0,025 mmol/l meßbar (Weissbach A. et al., 1971). Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP) schließlich inhibiert in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis zu 70 % der β - und der γ -Polymerase-Aktivität, aber bis zu 50 $\mu\text{mol/l}$ nicht die α -Polymerase (Wist E., 1979; Ono K. et al., 1979).

N-Ethylmaleimid (NEM) und para-Chloromercuribenzoat (pCMB) wurden im ersten Versuch in steigenden Konzentrationen in Standardreaktionstests eingesetzt. Die Wirkung zeigt Abbildung 15.

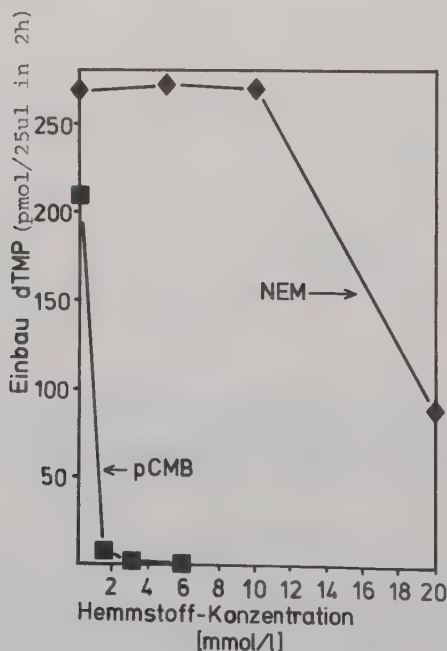


Abbildung 15: Einfluß von NEM und pCMB auf die DNA-Polymerase C, gemessen in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen des Hemmstoffes.

NEM zeigt bis zu einer Konzentration von 10 mmol/l keine Hemmung. Erst bei 16 mmol/l ist eine 50 %ige Inhibition erkennbar. Dagegen zeigt pCMB schon bei < 2 mmol/l nahezu 100%ige Inhibition.

In der Abbildung 16 ist der Einbau unter dem Einfluß von Didesoxy-Thymidintriphosphat aufgetragen.

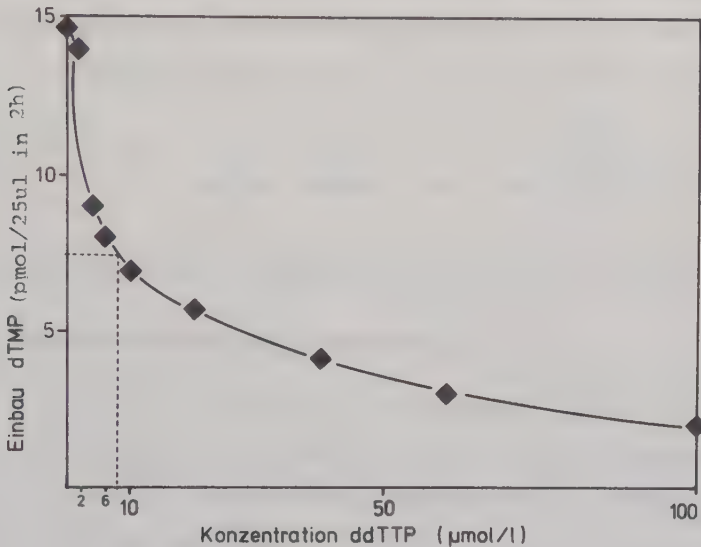


Abbildung 16: Einfluß von ddTTP auf die DNA-Polymerase C, gemessen in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen ddTTP. In der Abbildung ist 50 %ige Hemmung hervorgehoben.

Dieser Hemmstoff zeigt 50%ige Wirkung schon bei 8 umol/l ddTTP.

Als nächster Inhibitor wurde Actinomycin D ausgetestet. Dieser Stoff assoziiert mit der DNA, indem er sich über ein Guanosin-Cytosin-Basenpaar in der Helix schiebt (inter-

kaliert) und macht somit das Template unzugänglich. Er reagiert aber nicht mit RNA (Müller W. & Crothers D.M., 1968). So sollte, da ja ein RNA-Template verwendet wird, keine Hemmung beobachtet werden.

Bei Verwendung eines DNA-Templates dagegen würde Actinomycin D das Ablesen des Templates und damit einen Einbau von Desoxynukleotiden in einen neuen Strang verhindern.

Wie Tabelle VI zeigt, war selbst bei einer Zugabe von 50 ug/ml noch fast keine Hemmung meßbar:

Tabelle VI. EINFLUSS VON ACTINOMYCIN D AUF DIE DNA-POLYM. C

Testbedingungen	Einbau dTMP / 25 ul in 2 ^h	
	cpm	pmol
Standard (s. 3.4)	10 500	18
+ Actinomycin D (50 ug/ml)	9 700	16

4.1.9 Abhängigkeit von DMSO

Dimethylsulfoxid (DMSO) zeigt verschiedentlich stimulierende Wirkung auf DNA polymerisierende Enzyme (Bauer G., 1976). So wurde auch hier der Einfluß auf die Polymerase "C" getestet (Tab. VII).

Verschiedene Mengen DMSO wurden zum Standardreaktionsansatz hinzugefügt. Bei 0,3% DMSO stieg die Aktivität um ca.

50%, bei Konzentrationen ab 1% DMSO um fast 100% :

Tabelle VII. EINFLUSS VON DMSO AUF DIE DNA-POLYMERASE C

Testbedingungen	Einbau dTMP / 25 μ l in 2 ^h	
	cpm	pmol
Standard (s. 3.4)	10 200	17
+ DMSO (0,3%)	15 600	26
+ DMSO (1 %)	19 300	32
+ DMSO (5 %)	19 200	32

4.1.10 Einfluß nichtionischer Detergentien

Wu A.M. & Cetta A. (1975) beschreiben eine stimulierende Wirkung von nichtionischen Detergentien auf DNA-Polymerase. Bauer G. (1976) stellte eine Hemmung eines DNA-polymerisierenden Enzymes fest.

So wurden die beiden nichtionischen Detergentien NP 40 und Triton X 100 auch auf ihre Wirkung auf die DNA-Polymerase "C" geprüft (Tab. VIII).

Das Detergens wurde in verschiedenen Konzentrationen zum Standardansatz zugegeben.

Tabelle VIII. EINFLUSS NICHTIONISCHER DETERGENTIEN AUF DIE
DNA-POLYMERASE C

Testbedingungen	Einbau dTMP / 25 μ l in 2 ^h	
	cpm	pmol
Standard (s. 3.4)	14 400	26
+ NP40 (0,03%)	14 600	26
+ NP40 (0,1 %)	14 300	26
+ Triton X100 (0,03%)	10 200	17
+ Triton X100 (0,1 %)	6 400	11

NP 40 zeigt nicht einmal in einer Konzentration von 0,1% einen Einfluß auf die Polymerase-Aktivität. Triton X 100 dagegen hemmt das Enzym: ca. 35% bei 0,03% Triton und ca. 58% bei 0,1% Triton-Zusatz.

4.1.11 Zwischenzusammenfassung

Die bisher beschriebenen Versuche zeigten, daß aus *Neurospora crassa* von den DNA-Polymerasen A und B eine dritte DNA-Polymerase-Aktivität chromatographisch zu trennen ist. Nach einer ersten Anreicherung unterscheidet sie sich von A und B in mehreren Eigenschaften:

- (1) sie bevorzugt poly(rA)(dT) als Template;

- (2) das Temperaturoptimum liegt bei 20° C;
- (3) die Ionenoptima für Mg^{2+} , Mn^{2+} und K^{+} sind von jenen der A- und B-Polymerase verschieden;
- (4) die Präferenz bei divalenten Kationen liegt bei Mn^{2+} ;
- (5) das pH-Optimum liegt bei 8,0;
- (6) die Aktivität ist hemmbar durch pCMB oder ddTTP, nicht durch NEM oder Actinomycin D.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Annahme gerechtfertigt, daß es sich bei dieser dritten DNA-Polymerase-Aktivität um ein neues, bisher in *Neurospora crassa* nicht bekanntes Enzym handelt.

Es muß nun festgestellt werden, ob nach weiterer Reinigung zusätzliche Unterschiede zu A und B gefunden werden können.

Auch ist ein Vergleich mit den bisher aus anderen Eukaryoten isolierten DNA-Polymerasen zu treffen.

4.2 Weitere Reinigung der DNA - Polymerase C

4.2.1 Versuche zur Konzentrierung der DNA - Polymerase enthaltenden Fraktionen

Zur weiteren Isolierung und Charakterisierung der DNA-Polymerase C war zunächst das Volumenproblem zu lösen. Mit den vereinigten aktiven Fraktionen aus der zweiten DE 23-Säule (insgesamt 6,3 Liter) war es nicht möglich, im üblichen Labormaßstab zu arbeiten. Es mußte erst eine Einengung des Volumens auf etwa 1/10 erreicht werden, ohne dabei aber allzuviel Aktivität zu verlieren. Dazu wurden zunächst mit jeweils kleinen Proben nachstehende Methoden ausgetestet.

4.2.1.1 Ammoniumsulfatfällung

Der erste Versuch bestand darin, die DNA-Polymerasen mit Ammoniumsulfat auszufällen, wie im Teil Methoden (3.15.6) beschrieben. Die fraktionierte Aussalzung und die anschließenden Tests auf Polymerase-Aktivitäten jeweils im Überstand und im Sediment brachten die in Abbildung 17 und Tabelle IX gezeigten Ergebnisse.

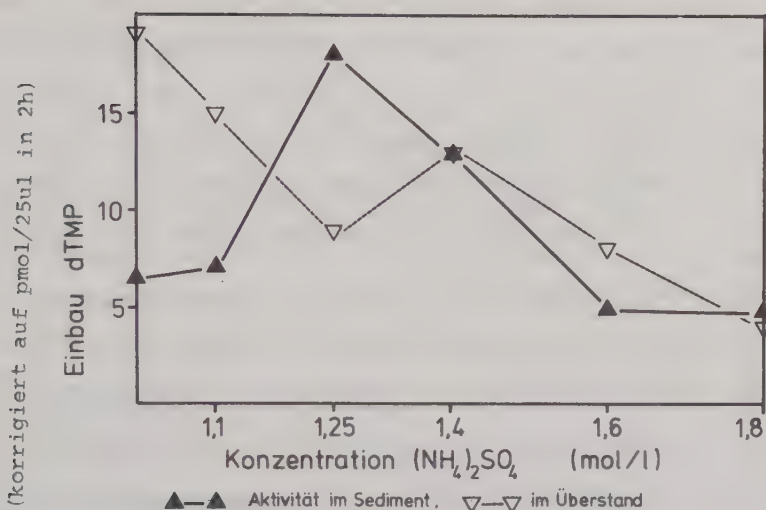


Abbildung 17: Fraktionierte Fällung der DNA-Polymerase C mit Ammoniumsulfat, wie in 3.15.6 beschrieben. Die Aktivitäten wurden im Standardtest (s. 3.4) gemessen. Entsprechend der Volumenzunahme beim Aussalzen wurden die gezählten Einbauwerte des Überstandes korrigiert. Das jeweils abzentrifugierte Präzipitat wurde stets in je 0,5 ml TEMG resuspendiert.

Tabelle IX. KONZENTRIERUNG DURCH AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

	Volumen ml	Einbau dTMP /25 ul in 2 ^h cpm	Ausbeute pmol %
vor der Fällung	50	6 600	11 100
nach Fällung bei			
1,25 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6	5 500	9 10

(Standardtestbedingungen, nach 3.4). Die Fällung erfolgte wie in 3.15.6 beschrieben. Das Präzipitat wurde in 6 ml TEMG resuspendiert.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, ergibt sich eine optimale Fällung des C-Enzyms mit 1,25 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bei dieser Konzentration ist die Aktivität im Sediment (resuspendiert in TEMG und dialysiert) am höchsten, nämlich etwa 70 % der gesamten Aktivität von Niederschlag + Überstand.

Bei höheren Konzentrationen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fällt die Gesamtaktivität stark ab. Wahrscheinlich wird dabei das Enzym inaktiviert worden sein.

Die Tabelle IX zeigt jedoch, daß die Gesamtaktivität nach der Fällung stark abgenommen hat, d.h. die Ausbeute betrug nur 10 % und war damit so niedrig, daß dieses Verfahren für weitere Versuche nicht in Frage kam.

4.2.1.2 Einengung durch Konzentrationsdialyse

Eine aktive Probe wurde, wie in 3.15.1 beschrieben, in PEG 6000-Lösung (30 %) auf 1/10 Volumen konzentriert.

Wie Tabelle X zeigt, sank die Aktivität/ml trotz Volumeneinengung von 6000 cpm/25 μl auf 600 cpm/25 μl ab, was bedeutet, daß diese Methode wegen Inaktivierung des Enzyms nicht zu verwenden war.

Tabelle X. KONZENTRIERUNG IN PEG 6000

	Volumen ml	Einbau cpm	dTMP /25 μ l in 2h pmol	Ausbeute %
vor Konzentrierung	100	6 000	10	100
nach Konzentrierung	10	600	1	0

Durchführung der Versuche wie in 3.15.1 beschrieben; Aktivitätsmessungen im Standardtest (s. 3.4).

4.2.1.3 Säurefällung

Wie die Tabelle XI zeigt, brachte auch die Säurefällung und anschließende Resuspension in ca. 1/10 (nach pH 4,0) bzw. 1/100 (nach pH 3,5 und 3,0) Ausgangsvolumen keine befriedigenden Werte. Die Ausbeute betrug wiederum nur 10 % bzw. 1 % der Ausgangsaktivität. Bei pH-Werten über 4,0 war noch kein Sediment festzustellen.

Tabelle XI. SÄUREFÄLLUNG DER DNA-POLYMERASE C

	Volumen ml	Einbau cpm	dTMP /25 μ l in 2h pmol	Ausbeute %
vor der Fällung	100	6 600	11	100
nach Fällung bei pH:				
4,0	10	6 400	11	10
3,5	1	6 100	10	1
3,0	1	6 200	10	1

Durchführung der Fällung wie unter 3.15.2 beschrieben; Messung der Aktivitäten im Standardtest (s. 3.4).

Mit einer fraktionierten pH-Fällung konnte bei diesen Versuchen auch der isoelektrische Punkt pI der DNA-Polymerase C bestimmt werden.

Wie die Abbildung 18 zeigt, begann die Aktivität rapide bei einem pH-Wert von 5,2 zu fallen. Bei pH 5,0 waren nurmehr knapp 50 % meßbar.

Der isoelektrische Punkt kann somit für die C-Polymerase mit etwa $pI = 5,1$ angegeben werden.

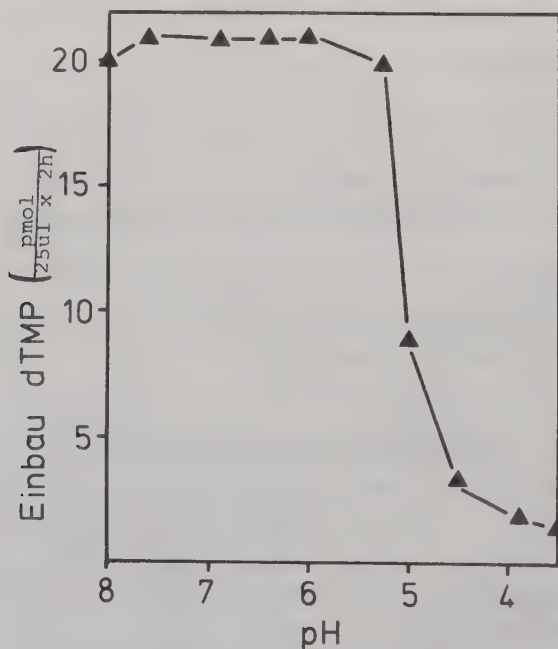


Abbildung 18: Bestimmung des isoelektrischen Punktes pI der DNA-Polymerase C. Durchführung des Versuches wie in 3.15.2 beschrieben; Messung der Aktivitäten im Standardtest (s. 3.4).

4.2.1.4 Alkoholfällung

Als nächstes wurde versucht, die Polymerase-Aktivität mit 40 % Äthanol auszufällen und in 1/10 Volumen zu resuspendieren (vgl. 3.15.3). Aber auch dieses Experiment schlug fehl, da die Ausbeute, wie Tabelle XII zeigt, unter 5 % lag.

Tabelle XII. FÄLLUNG MIT ÄTHANOL

	Volumen ml	Einbau /25 ul in 2 ^h cpm	dTMP in 2 ^h pmol	Ausbeute %
vor der Fällung	100	6 600	11	100
nach der Fällung				
(40% EtOH; 12 h; -20° C)	5	6 300	10	< 5

Die Fällung mit Äthanol erfolgte wie unter 3.15.3 beschrieben, die Aktivitätsmessung im Standardtest (s. 3.4).

4.2.1.5 Amicon - Filtration

Eine bewährte Methode, Proteinlösungen schonend zu konzentrieren, ist die Einengung durch Ultrafiltration. Die Firma Amicon bietet zu diesem Zweck verschiedene Membranen an, die jeweils Moleküle bis zu einem definierten maximalen Molekulargewicht passieren lassen, alle anderen aber zurückhalten. Die hier verwendete Ultrafiltrationsmembran UM 10 hat ein solches Ausschluß-Molekulargewicht von 10.000 d, d.h. alle Moleküle unter 10.000 d werden im Dialysat entfernt. Das bedeutet, daß praktisch alle Proteine zurück-

gehalten werden.

Bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich, daß bei steigenden Volumina auch steigende Drucke bis über 3 bar notwendig wurden. Die Enzymlösung enthielt noch soviel Protein, daß die Poren der Filtermembran nach kurzer Zeit verstopft waren.

Damit war es aber doch möglich, die Probe von 100 ml auf 15 ml einzuengen. Die Aktivität ging jedoch dabei zum großen Teil verloren. Die Ausbeute betrug, wie Tabelle XIII zeigt, nur rund 15 %.

Tabelle XIII. KONZENTRATION DURCH AMICON-FILTRATION

	Volumen ml	Einbau dTMP /25 ul in 2 ^h cpm	pmol	Ausbeute %
vor der Filtration	100	6 600	11	100
nach der Filtration	15	6 000	10	15

Die Filtration erfolgte durch UM 10-Membranen von der Firma Amicon wie unter 3.15.4 beschrieben. Die Aktivität wurde im Standardtest gemessen (s. 3.4).

4.2.1.6 Konzentrierung über "Affi-Gel Blue"

Die "Affi-Gel Blue" Säule wurde mit einer 50 ml-Probe beschickt, gewaschen und mit einem Gradienten von 0 bis 1,5 mol/l KCl in TEMG eluiert. Die Fraktionen zu 0,5 ml wurden auf DNA-Polymerase-C-Aktivität getestet. Die aktiven

Fraktionen wurden vereint, was ein Gesamtvolumen von 1,5 ml ergab.

In diesen vereinigten Fraktionen war eine Aktivität von 5.800 cpm = 10 pmol Einbau dTMP pro 25 μ l enthalten, was einer Ausbeute von etwa 2 %, bezogen auf den Ausgangswert, entspricht (Tabelle XIV). Das Verfahren ist somit ungeeignet.

Tabelle XIV. KONZENTRIERUNG ÜBER "AFFI-GEL-BLUE"

	Volumen ml	Einbau dTMP /25 μ l in 2 ^h cpm	pmol	Ausbeute %
vor der Säule	50	6 600	11	100
nach der Säule	1,5	5 800	10	2

Die Vorbereitung der Säule erfolgte nach 3.3.3, die Konzentrierung nach 3.15.5, die Messung der Aktivität im Standardtest (s. 3.4).

4.2.1.7 Konzentrierung im "batch"-Verfahren

Da alle bisher durchgeführten Versuche zur Einengung des Volumens stets mit einem Verlust der DNA-Polymerase-C-Aktivität verbunden waren, ließen sich diese nicht weiter anwenden.

Aus den ersten Reinigungsschritten (s. 4.1.2) war aber bekannt, daß dieses Enzym an DEAE-Cellulose bindet und mit etwa 0,6 mol/l KCl eluiert werden kann. Wenn es nun möglich

wäre, die gesamte Enzymmenge an die Cellulose-Matrix zu binden und mit möglichst geringem Volumen zu eluieren, sollte damit eine Konzentrierung der Aktivität erreicht werden können. Um die Elution mit kleinem Volumen durchzuführen, müßte sie im "batch"-Verfahren erfolgen.

Die Ausführung dieses Experimentes geschah, wie im Teil Methoden unter 3.15.7 beschrieben, mit der DEAE-Cellulose DE 23.

Ein Vorversuch mit 100 ml enzymhaltiger Lösung brachte befriedigende Ergebnisse mit einer Ausbeute > 80 %.

So wurde, in mehreren Einzelexperimenten, schließlich die gesamte noch verbliebene Menge von knapp 6 Litern, welche die DNA-Polymerasen nach der DE 23-II Säule enthielten (vgl. 4.1.2), mit dieser Methode auf 800 ml eingengt.

Die erhaltene Aktivität der C-Polymerase war so hoch, daß sich, bezogen auf die Ausgangsaktivität in den ursprünglichen 6,3 Litern, eine Ausbeute von 73 % ergab. Dieses Ergebnis zeigt Tabelle XV.

Tabelle XV. KONZENTRIERUNG DER DNA-POLYMERASE C
IM "BATCH"-VERFAHREN

	Volumen ml	Einbau dTMP /25 μ l in 2 ^h cpm	Ausbeute pmol %
vor der Konzentrierung	6 300	8 000	14
nach der Konzentrierung	800	48 000	80

Durchführung des Versuches wie unter 3.15.7 beschrieben.
Aktivitätsmessungen im Standardtest (s. 3.4).

4.2.2 Reinigung des C-Enzyms über weitere Chromatographie-Säulen

Da es nunmehr gelungen war, die gesamte C-Aktivität auf ein Volumen von 800 ml zu konzentrieren, war es möglich, im weiteren Verlauf der Experimente im üblichen Labormaßstab zu arbeiten. Das C-Enzym konnte jetzt weiter gereinigt werden.

Um es zunächst von den DNA-Polymerasen A und B zu trennen, wurde als erstes eine Säulenchromatographie auf DEAE-Cellulose durchgeführt. Die Aktivitäten mit den beiden Templates KT-DNA und poly(rA)(dT) in den einzelnen Elutionsfraktionen zeigt die Abbildung 19.

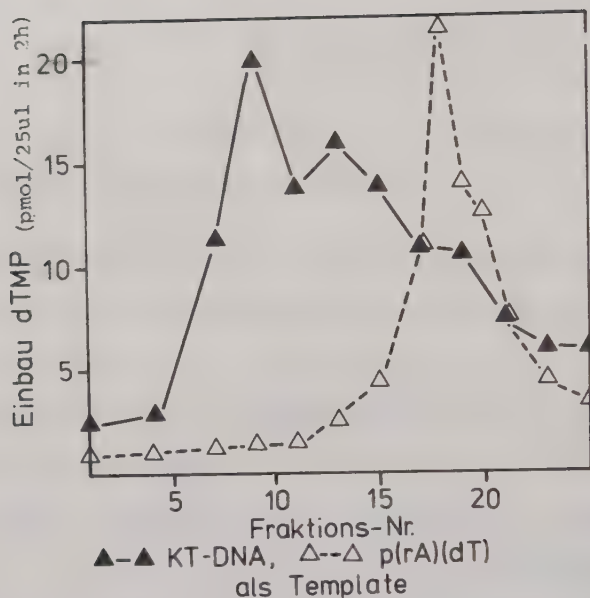


Abbildung 19: Elution von der ersten DE 52-Säule (DE 52-I). Die Vorbehandlung der Säule (5 cm Durchmesser, 40 cm Höhe, 600 ml DE 52) erfolgte nach 3.3.1. Gewaschen wurde mit 1200 ml TEMG, eluiert mit 1200 ml eines KCl-Gradienten (0 - 0,8 mol/l KCl in TEMG). Fraktionen zu 50 ml wurden gesammelt und deren Aktivität im Standardtest (s. 3.4) gemessen.

Wiederum ist die deutliche Trennung der Polymerase C von A und B zu erkennen. Um noch mehr Fremdproteine abzutrennen, folgte ein weiterer Schritt über eine DE 52-Säule. Diesmal allerdings getrennt für die Fraktionen, die die Polymerasen A und B enthielten (Nr. 7 - 14, 400 ml), sowie die Fraktionen mit dem C-Enzym (Nr. 16 - 20, 250 ml).

Die Elutionsprofile dieser beiden Säulen sind in der Abbildung 20 wiedergegeben.

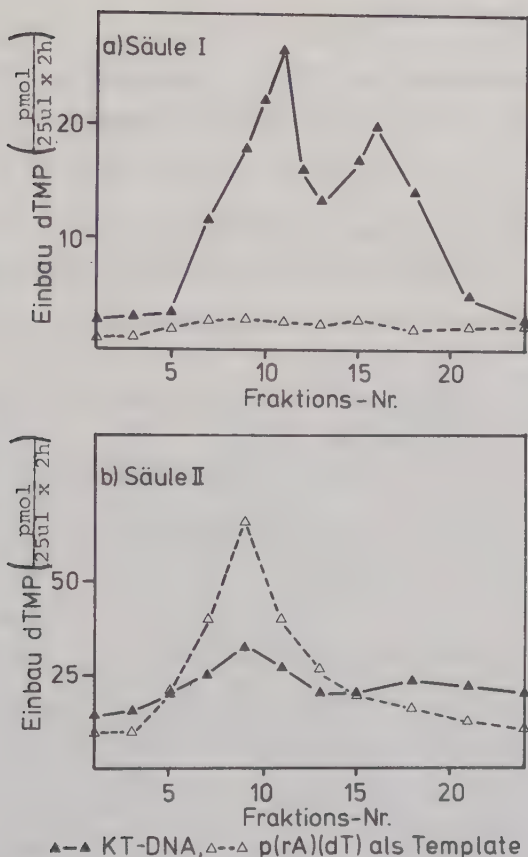


Abbildung 20: Elution von der zweiten DE 52-Säule (DE 52-II):

a) DNA-Polymerasen A und B (Säule I); b) DNA-Polymerase C (Säule II)

Vorbehandlung der Säulen (je 2,5 cm Durchmesser, 30 cm Höhe, 100 ml DE 52) nach 3.3.1. Gewaschen wurde mit je 200 ml TEMG, eluiert mit je 150 ml 0 - 0,8 mol/l KCl in TEMG. Fraktionen zu je 6 ml wurden gesammelt und nach 3.4 im Standardtest auf Aktivität geprüft.

Von der Säule I wurden die Fraktionen mit den Polymerasen A bzw. B getrennt gesammelt und für spätere Vergleichstests

bei -80°C eingefroren.

Die Fraktionen mit dem C-Enzym aus der Säule II (Nr. 7 mit 11) wurden ebenfalls vereinigt (es ergaben sich 30 ml), ausdialysiert und auf eine DNA-Cellulose-Säule aufgetragen.

Die Elution mit einem KCl-Gradienten ergab bei $0,62\text{ mol/l}$ KCl ein scharfes Maximum der C-Aktivität (s. Abbildung 21). Die Fraktionen Nr. 9 mit 12 wurden gesammelt.

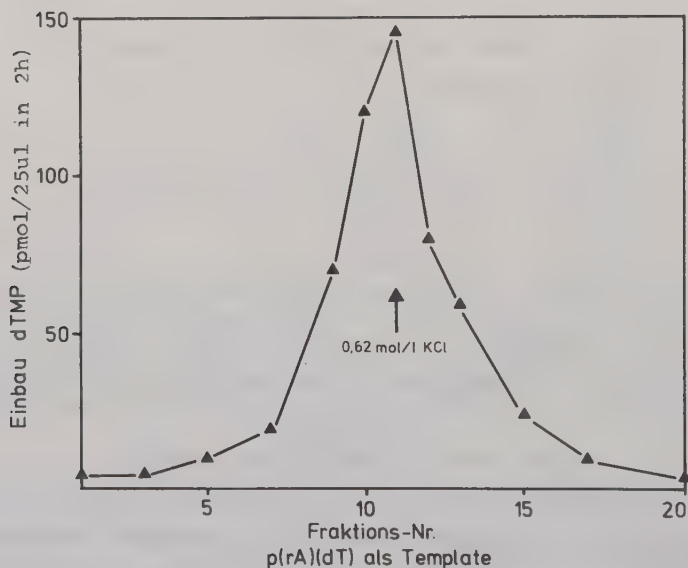


Abbildung 21: Elution der DNA-Polymerase C von der DNA-Cellulose-Säule. Die Vorbereitung der Säule (Durchmesser 1 cm, Höhe 10 cm, 7 ml DNA-Cellulose) erfolgte nach 3.3.2. Gewaschen wurde mit 20 ml TEMG, eluiert mit 10 ml eines KCl-Gradienten ($0,15 - 1,0\text{ mol/l}$ KCl in TEMG). Fraktionen zu 0,5 ml wurden gesammelt und auf Aktivität geprüft (Standardtest, vgl. 3.4.2).

Einen gesamten Überblick der Reinigung der DNA-Polymerase

C gibt nachstehendes Anreicherungsschema. Daraus sind auch Proteingehalt, spezifische Aktivität und Anreicherung zu entnehmen. Die Werte sind gerundet.

ANREICHERUNGSSCHEMA

=====

Nr.	Fraktion	Vol. ml	Prot. ug/ml	Aktivität der C-Polymerase:			spezif. Aktiv. pmol/mg Prot.	An- rei- che- rung
				cpm /25 ul	pmol /ml	pmol /ml		
1	Ü 100.000 g	20000	1700	5900	9,8	392	230	-
2	DE 23-I	9000	1600	19200	32	1280	800	3,5
3	DE 23-II	6300	230	8000	14	560	2400	10
4	nach batch	800	210	48000	80	3200	15000	65
5	DE 52-I	220	14,3	12000	20	800	56000	242
6	DE 52-II	30	7,1	33000	55	2200	310000	1340
7	DNA-Cellulose	2,5	6,75	87000	145	5800	860000	>3700

Aus dem Schema ergibt sich eine Gesamtanreicherung des C-Enzyms von über 3.700fach nach dem letzten Schritt (der DNA-Cellulose-Säule).

4.2.3 Haltbarkeit der hochgereinigten C-Enzymaktivität

Die aktiven Fraktionen nach der DNA-Cellulose wurden auf kleine Proben verteilt und verschieden eingefroren.

Ein Teil wurde in flüssigem Stickstoff gelagert, ein

anderer bei -80°C .

Zum Durchführen von Haltbarkeitstests wurden Proben auch bei -20°C (mit und ohne Glyzerinzusatz) und im Eisbad aufbewahrt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und auf verbliebene Aktivität geprüft. Eine Übersicht gibt Tabelle XVI:

Tabelle XVI. HALTBARKEIT DER ENZYMAKTIVITÄT (C-Enzym)

	Einbau dTMP/25 μl in 2 ^h
	pmol

vor dem Test	25
bei 0°C :	
nach 2 Stunden	20
nach 4 Stunden	12
nach 6 Stunden	6
nach 12 Stunden	5
bei -20°C :	
nach 2 Stunden	25
nach 12 Stunden	24
nach 1 Tag (24 Stunden)	24
nach 8 Tagen	20
nach 14 Tagen	15
nach 21 Tagen	10
nach 30 Tagen	8

(Tabelle XVI. Haltbarkeit der Enzymaktivität - Fortsetzung)

Einbau dTMP / 25 μ l in 2^h

pmol

bei -20° C + 40% Glyzerin:

nach 1 Tag	24
nach 8 Tagen	22
nach 21 Tagen	18
nach 30 Tagen	15
nach 60 Tagen	6

bei -80° C:

nach 1 Tag	25
nach 30 Tagen	25
nach 60 Tagen	25
nach 90 Tagen	25
nach 6 Monaten	24
nach 12 Monaten	22

in flüssigem Stickstoff (Gasphase; -100° C):

nach 12 Monaten	25
-----------------	----

(Standardtestbedingungen, nach 3.4)

Vor dem Test wurden von 25 μ l Enzymlösung in 2 Stunden bei 20° C 25 pmol dTMP eingebaut (mit poly(rA)(dT) als Template).

Bei den verschiedenen Lagertemperaturen und -bedingungen verlor das Enzym rasch seine Aktivität. Erst bei einer Temperatur von $< -80^{\circ}\text{C}$ blieb es über längere Zeit (mindestens 1 Jahr) stabil.

Da es selbst bei -20°C , sogar nach Zusatz von 40 % Glyzerin, nach einem Monat schon 40 % Aktivitätsverlust zeigte, muß es als sehr temperaturempfindlich bezeichnet werden.

4.2.4 Zwischenzusammenfassung

Wie sich gezeigt hat, konnte die große Ausgangsmenge der C-Polymerase-enthaltenden Fraktionen nur im "batch"-Verfahren mit erträglichem Aktivitätsverlust konzentriert werden.

Die weitere Reinigung des Enzyms über mehrere säulenchromatographische Schritte (DE 52, DNA-Cellulose; s. 4.2.2) brachte eine Anreicherung von über 3700fach. Verglichen mit der Anreicherung der Polymerasen A und B (Joester W., et al., 1978), ist sie doppelt so hoch. Das Enzym kann aber noch nicht als "rein" bezeichnet werden. Dazu wären noch weitere Schritte notwendig (z.B. Säulenchromatographie an Phosphocellulose, Sepharose, usw. oder Gradientenzentrifugation o.ä.). Es war jedoch genügend gereinigt, um eine genauere Charakterisierung der C-Polymerase durchführen zu können.

4.3 Weitere Charakterisierung des C-Enzyms

Wie schon eingangs erwähnt (s. 1.7), ging ich von Anfang an von der These aus, daß es sich bei der dritten DNA-Polymerase um ein eigenes Enzym handelt, das mit den von Joester K.E. und Mitarbeitern in diesem Labor isolierten Polymerasen A und B nicht verwandt, sondern den β -Polymerasen höherer Eukaryoten ähnlich ist.

Obwohl ein solches Enzym in niederen Eukaryoten bisher noch nicht gefunden werden konnte, waren alle Versuche darauf ausgerichtet, diese Behauptung zu stützen - oder zu widerlegen.

Erste Versuche mit einer grob gereinigten Fraktion des C-Enzyms (vgl. 4.1) bestätigten schon diese Vermutung. Zu einer genaueren Charakterisierung mußte das Enzym aber weiter gereinigt werden. Das war erst möglich, als es gelungen war, das Volumen so einzuengen, daß damit im üblichen Labormaßstab gearbeitet werden konnte (vgl. 4.2).

Schließlich lag die C-Polymerase in genügender Reinheit vor, daß damit nachstehende Versuche durchgeführt werden konnten, die entweder dazu geeignet waren, diese Polymerase als β -ähnlich zu bestimmen, oder darzulegen, daß sich das Enzym im gereinigten Zustand ebenso verhält wie vorher, daß also beispielsweise keine für die enzymatischen Funktionen entscheidenden Faktoren abgetrennt worden sind.

4.3.1 Immunologische Charakterisierung

Von der hochgereinigten Fraktion aus der DNA-Cellulose-Säule (s. 4.2.2), die das C-Enzym enthielt, wurde 1 ml abgenommen und auf das vierfache Volumen verdünnt. Wie unter 3.12 beschrieben, wurde damit ein Kaninchen geimpft und das Antiserum gewonnen. Zum Vergleich wurden zwei weitere Kaninchen mit Proben geimpft, welche das A- bzw. B-Enzym enthielten (aus der DE 52-II Säule, s. 4.2.2).

Die aus diesen drei Kaninchen gewonnenen Seren sollten Antikörper gegen die einzelnen Polymerasen enthalten. Nachdem Kreuztests (s. 3.14) mit den ungereinigten Seren keine eindeutigen Ergebnisse erkennen ließen, wurden die Immunglobuline G (IgG) isoliert. Die Beschreibung dieser Methode ist unter 3.13 zu finden.

In einem Kreuzreaktionstest (nach 3.14) wurden die gereinigten Immunglobuline aus den drei verschiedenen Seren einzeln jeweils in drei Ansätzen mit den Polymerasen A, B bzw. C inkubiert. Die verbliebene Enzymaktivität wurde im Standardreaktionsansatz gemessen.

Tabelle XVII. KREUZREAKTION MIT IMMUNGLOBULIN IgG

Enzym	Einbau dTMP (pmol / 25 ul in 2 ^h)			
	+ anti-A	+ anti-B	+ anti-C	ohne IgG
A	1	36	40	39
B	20	4	28	30
C	21	22	2	22

"Holländer"-Kaninchen wurden mit gereinigten Fraktionen der Polymerasen A, B bzw. C beimpft (nach 3.12). Aus den gewonnenen Antiseren wurden die Immunglobuline G gereinigt (s. 3.13). Der Kreuzreaktionstest wurde durchgeführt wie in 3.14 beschrieben. Die verbliebenen Enzymaktivitäten wurden in Standardtests (s. 3.4) gemessen.

Wie die Tabelle XVII zeigt, reagierten die Immunglobuline aus den Kaninchenserum jeweils nur mit derjenigen Polymerase, welche in der Probe enthalten war, womit das Tier geimpft war.

Das IgG "anti-A" inaktivierte das A-Enzym fast völlig, blieb aber bei dem B- und dem C-Enzym wirkungslos. Entsprechend verhielten sich anti-B und anti-C.

Das Ausbleiben von "Kreuzreaktionen", also z.B. eine Inaktivierung des C-Enzyms durch anti-A oder anti-B usw., zeigt deutlich, daß es sich bei den Polymerasen A, B und C um drei unterschiedliche Proteine handelt, die keine Strukturgleichheiten aufweisen.

4.3.2 Spezifität des homopolymer - abhängigen Einbaus

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Spezifität des Einbaus mit dem gereinigten Enzym zu kontrollieren.

Die Polymerase sollte bei einem bestimmten Template nur das basenpaarende Nukleotid einbauen.

Im Standardreaktionsansatz wurde, um das zu prüfen, zu den Templates poly(rA)(dT) bzw. poly(rC)(dG) als markiertes Triphosphat jeweils einmal ^3H -dGTP und einmal ^3H -dTTP angeboten. Der Einbau wurde wie üblich gemessen (vgl. 3.4).

Tabelle XVIII. NUKLEOTIDSPEZIFITÄT DER GEREINIGTEN DNA-POLYMERASE C

markiertes	Einbau dNMP (pmol/25 ul in 2 ^h) bei Template:	
	poly(rA)(dT)	poly(rC)(dG)
3H-dNTP		
3H-dGTP	0	2
3H-dTTP	27	0

Der Einbau wurde im Standardtest (s. 3.4) gemessen, in dem jeweils die in der Tabelle angegebenen Kombinationen von Template/Primer und markiertem Triphosphat vorlagen. Ein Blindwert von 1100 cpm ist abgezogen.

Damit kommt zum Ausdruck, daß die Nukleotidspezifität absolut zutrifft. Es wird nur das passende Nukleotid eingebaut. Das Enzym ist also, wie im ungereinigten Zustand (vgl. 4.1.3 und 4.1.4), vom Template abhängig.

4.3.3 RNase Empfindlichkeit des Einbaus

Bei den Tests auf Aktivität der DNA-Polymerase C dient als Template eine (synthetische) RNA. Daher muß angenommen werden, daß sich die Polymerase-Reaktion Ribonuklease-sensitiv zeigt, da durch eine RNase das Template verdaut würde.

Zum Standardansatz wurde Ribonuklease T1 zugefügt. Das Ergebnis, wie es in Tabelle XIX angeführt ist, zeigt, daß der Einbau des dNMP von 22 auf 7 pmol/25 ul in 2^h sinkt, d.h. die Reaktion ist RNase-sensitiv.

Tabelle XIX. ABHÄNGIGKEIT VON RNASE

Testbedingungen	Einbau dTMP/25 ul in 2 ^h	
	cpm	pmol
Standard	13 100	22
+ RNase	4 300	7

Durchführung der Messungen nach Standardbedingungen (s. 3.4). Dem zweiten Ansatz waren 200 ug/ml RNase T1 zugesetzt.

4.3.4 Einfluß von EDTA auf die Aktivität

Das chelatbildende Reagens Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) bindet zweiwertige Kationen wie Mg²⁺, Mn²⁺ usw. Dadurch werden Enzyme, die solche Ionen benötigen, in ihrer Wirkung gehemmt.

Da bei der Reaktion der DNA-Polymerase C Mangan-Ionen vorhanden sein müssen (s. 4.1.6), sollte auch das gereinigte Enzym durch EDTA inhibiert werden. Tabelle XX zeigt das Resultat.

Tabelle XX. ABHÄNGIGKEIT DER DNA-POLYMERASE C VON EDTA

Testbedingungen	Einbau dTMP / 25 μ l in 2 ^h	
	cpm	pmol
Standard	13 100	22
+ EDTA	2 300	4

Die Aktivität wurde im Standardtest gemessen (s. 3.4), dem im zweiten Ansatz 50 mmol/l EDTA zugesetzt waren.

Durch Zugabe von 50 mmol/l EDTA läßt sich die Einbaurate des dTMP im Standardtest von 22 auf 4 pmol senken. EDTA hemmt also wie erwartet die Polymerase-Aktivität.

4.3.5 Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit

Mit der gereinigten Polymerase C wurde ein Test durchgeführt, der die Einbaurate von dTMP in Abhängigkeit von der Zeit zeigen sollte. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen 5 Stunden bei 20° C. Proben wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen und auf Aktivität geprüft.

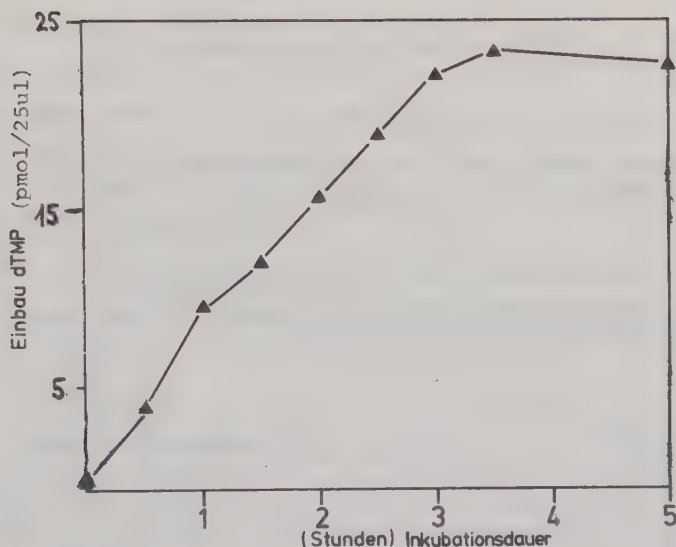


Abbildung 22: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C-Aktivität von der Inkubationsdauer.

Ein Standardreaktionsansatz (s. 3.4) wurde 5 Stunden bei 20° C inkubiert. Alle 30 min wurden Aliquots entnommen und auf Einbau dTMP getestet (s. 3.5).

Es zeigt sich ein lineares Ansteigen des Gesamteinbaus pro 25 ul enzymhaltiger Probe innerhalb der ersten 3,5 Stunden auf ein Maximum.

Das anschließende Abknicken der Kurve kann darauf zurückzuführen sein, daß nach dieser Zeit bei 20° C die Enzymaktivität nachläßt. Eine andere Erklärung wäre, daß das entstandene Produkt durch Nukleasen abgebaut wird, die trotz Reinigung noch mit dem Enzym assoziiert sind.

4.3.6 Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Eine Zugabe verschiedener Mengen Enzymlösung zum Standardansatz zeigte eine lineare Abhängigkeit der Reaktion bis sie bei etwa 25 μl ein Maximum erreicht.

Die in den Tests normalerweise eingesetzten 25 μl Enzymlösung führen also bereits zu maximalem Substrateinbau.

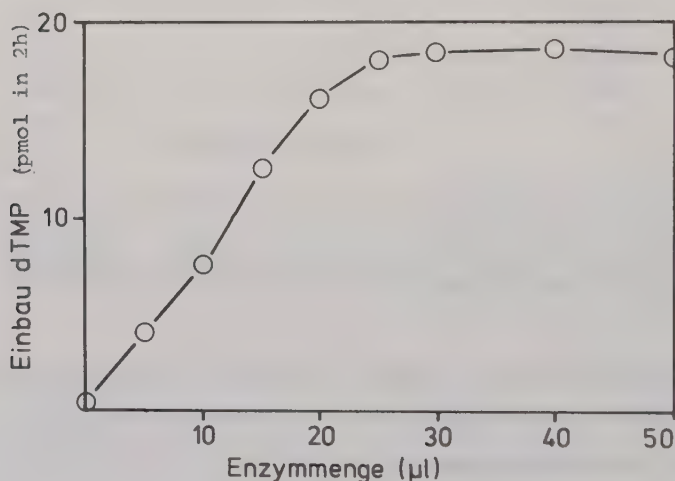


Abbildung 23: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C-Aktivität von der Enzymkonzentration (μl Enzymlösung in 100 μl Ansatz), gemessen im Standardtest (s. 3.4) mit steigenden Mengen Enzymlösung.

4.3.7 Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Der Einbau von dTMP durch die Polymerase C wurde gemessen in Abhängigkeit von der Menge vorhandenen Triphosphates.

Dazu wurden dem Standardansatz steigende Konzentrationen

an ^3H -dTTP zugesetzt.

Die Abbildung 24 zeigt einen nahezu linearen Anstieg bis etwa $3,5 \mu\text{mol/l}$ Substrat (dTTP), um dann ein Maximum zu erreichen.

Mit $50 \mu\text{mol/l}$ im Standardansatz lag das Substrat also stets in großem Überschuß vor.

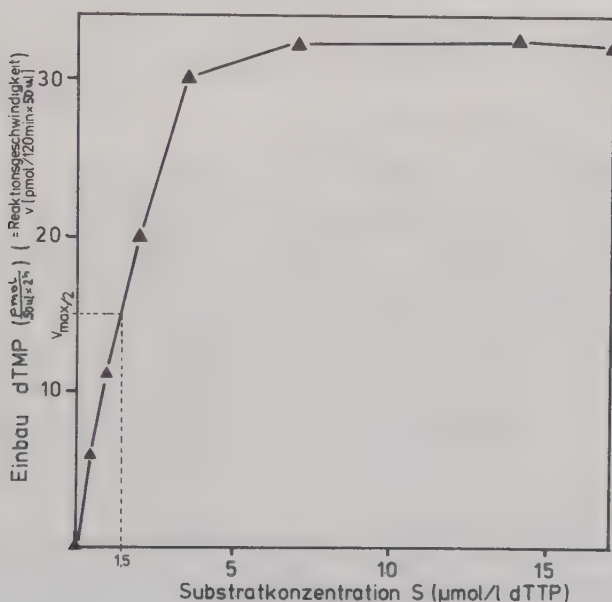


Abbildung 24: Abhängigkeit der DNA-Polymerase C-Aktivität von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Darstellung), gemessen in Standardtests (s. 3.4) mit steigenden Konzentrationen ^3H -dTTP und jeweils $50 \mu\text{l}$ enzymhaltiger Lösung.

4.3.8 Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Wird in der Abbildung 24 auf der Ordinate der Einbau dTMP (pmol/50 μ l in 2 Stunden) durch die Reaktionsgeschwindigkeit v ersetzt (= Einbau pmol in 2 Stunden bei 50 μ l Enzymlösung), so lässt sich aus dem Punkt, bei dem die halb-maximale Geschwindigkeit erreicht ist, auf der Abszisse der Abbildung 24 die Michaelis-Konstante K_m ablesen (Michaelis-Menten-Darstellung).

Überträgt man die Daten in ein Diagramm, in dem die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen wird, ergibt sich die Abbildung 25 (Lineweaver-Burk-Darstellung).

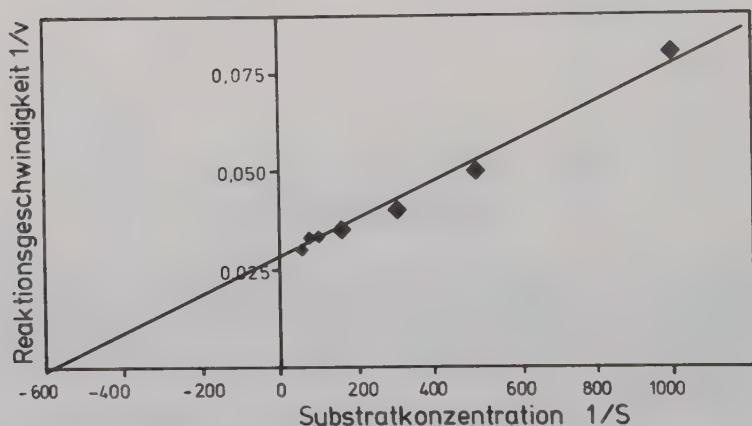


Abbildung 25: Bestimmung der Michaelis-Konstanten K_m (Lineweaver-Burk-Darstellung). Daten aus der Abbildung 24 übertragen.

Verlängert man die Gerade über die Ordinate hinaus,

ergibt der Schnittpunkt mit der Abszisse den negativen reziproken Wert der Michaelis-Konstante ($-1/K_m$).

Aus beiden Darstellungen (Abbildungen 24 und 25) läßt sich für die DNA-Polymerase C eine Michaelis-Konstante angeben von $K_m = 1,5 \text{ umol/l}$ für dTTP als Substrat.

4.3.9 Test auf Reverse Transkriptase Aktivität mit heteropolymerer RNA

Reverse Transkriptasen (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) werden immer mehr auch in nichtviralen oder nicht-virus-infizierten Zellen gefunden, z.B. in uninfizierten Hühnerembryos (Kang C.Y. & Temin H.M., 1972; dieselben, 1973; Temin H.M. et al., 1973; Bauer G. & Hofschneider P.H., 1976; Bauer G., 1976), in *Escherichia coli* (Romashchenko A.G. et al., 1977), oder in menschlicher Amnionflüssigkeit (Mondal H., 1977).

Da die DNA-Polymerase C ebenso wie Reverse Transkriptasen eine poly(rA)(dT)-abhängige Aktivität aufweist, könnte es sich bei ihr auch um eine Reverse Transkriptase handeln. Dann müßte sie allerdings auch mit natürlicher RNA als Template DNA-Synthese zeigen.

Dem Standardreaktionsansatz wurde als Template messenger-RNA für Globin (Globin-mRNA) zugegeben und der Einbau gemessen.

Als Vergleich diene der gleiche Ansatz mit Reverser Transkriptase aus AMV. In der Tabelle XXI ist das Ergebnis

zusammengefaßt.

Tabelle XXI. REVERSE TRANSKRIPTASE AKTIVITÄT DER DNA-
POLYMERASE C

Enzym	Einbau dTMP /25 ul in 2 ^h			
	Template-Primer			
	poly(rA)(dT) cpm	pmol	Globin-mRNA + (dT) ₁₂ cpm	pmol
C - Polymerase	13 500	22	0	0
Reverse Transkrip- tase (AMV) *	20 500	34	16 500	7

* Test mit Mg²⁺ anstelle von Mn²⁺

Die Aktivität wurde im Standardtest (s. 3.4) gemessen. Im zweiten Ansatz wurde anstelle von poly(rA)(dT) Globin-mRNA als Template eingesetzt, der als Primer 20 ug/ml oligo(dT)₁₂ zugegeben wurden. Als Substrat wurden alle vier Desoxynukleosidtriphosphate angeboten, die zur Erhöhung der Meßempfindlichkeit alle ³H-markiert waren (je 150 uCi/ml). In diesem Ansatz befanden sich keine nichtmarkierten Triphosphate.

Ein Blindwert von 1200 cpm ist abgezogen.

Während die "echte" Reverse Transkriptase (aus AMV) sowohl mit dem synthetischen Template poly(rA)(dT), als auch mit der natürlichen mRNA reagiert, zeigt das C-Enzym mit Globin-mRNA keine Aktivität.

Es handelt sich bei der Polymerase C also um keine Reverse Transkriptase. Das C-Enzym zeigte auch in diesem Versuch Eigenschaften wie eine β -Polymerase.

4.3.10 Thermische Inaktivierung

Wie jedes Protein ist auch die DNA-Polymerase C thermisch labil. Sie wird also bei einer bestimmten Temperatur nach gewisser Zeit inaktiviert.

Dabei unterscheidet sich die DNA-Polymerase β eukaryoter Zellen von der Polymerase α deutlich in ihrer Stabilität. So wird die β -Polymerase nach 10 Minuten bei 50° C zu 50 % inaktiviert, die Aktivität der α -Polymerase dagegen bleibt unter diesen Bedingungen noch voll erhalten (Dube D.K. et al., 1977).

Zunächst wurde das Enzym für 10 Minuten bei verschiedenen Temperaturen (von 20° bis 95° C) präinkubiert und die verbliebene Aktivität im Standardtest gemessen:

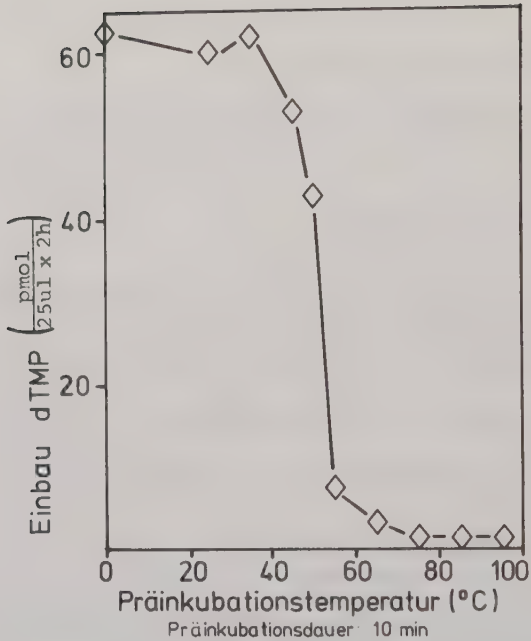


Abbildung 26: Thermische Inaktivierung der DNA-Polymerase C bei verschiedenen Temperaturen. Enzymlösungen wurden im Wasserbad mit den jeweiligen Temperaturen je 10 min inkubiert. Die verbliebenen Aktivitäten wurden in Standardtests (s. 3.4) gemessen.

Dabei stellte sich heraus, daß diese Polymerase bis zu einer Temperatur von etwa 45° C stabil blieb. Bei 60° C war sie jedoch nach 10 Minuten fast 100%ig inaktiviert.

So wurde als nächstes das C-Enzym Temperaturen von 50, 55 und 60° C verschieden lange (2 bis 20 Minuten) ausgesetzt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 27.

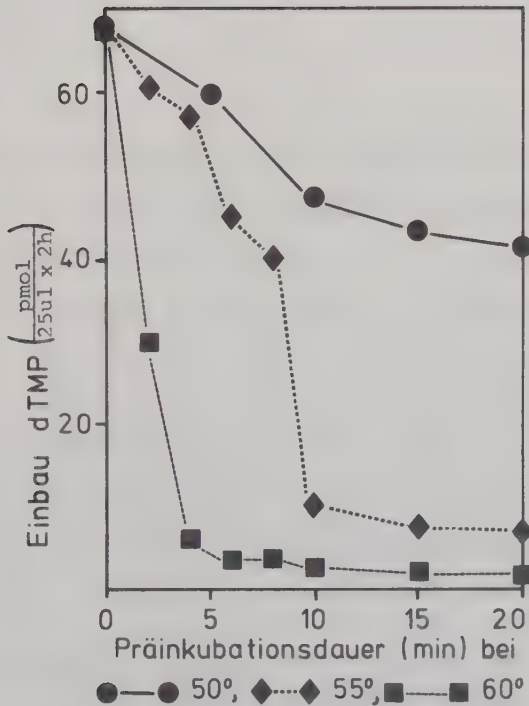


Abbildung 27: Thermische Inaktivierung der DNA-Polymerase C bei verschiedenen langen Zeiten. Enzymhaltige Lösungen wurden in Wasserbädern bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 min wurden Aliquots entnommen und in Standardtests (s. 3.4) auf verbliebene Polymerase-Aktivität geprüft.

Bei 50° C ist eine thermische Inaktivierung zu erkennen. Nach 20 Minuten hat das Enzym nurmehr 60 % der ursprünglichen Polymerase-Aktivität.

Bei 55° C erfolgte die Inaktivierung bereits wesentlich rascher, sodaß nach 10 min nur noch 15 % Restaktivität zu beobachten waren.

Bei 60° C Inaktivierungstemperatur schließlich fiel die Aktivität der Polymerase C innerhalb von 4 Minuten auf < 10 %.

4.3.11 Test auf Anwesenheit von Nukleasen

Prokaryotische DNA-Polymerasen besitzen außer der Polymerase-Aktivität gleichzeitig noch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, um eventuell falsch eingebaute Nukleotide gleich wieder abtrennen zu können (Brutlag D. & Kornberg A., 1972; Kornberg A., 1974; Topal M.D. & Fresco J.R., 1976; Alberts B. & Sternglanz R., 1977; Que B.G. et al., 1979).

Golomb M. & Grandgenett D.P. (1979) entdeckten auch eine assoziierte Endonuklease-Aktivität bei Avian Myeloblastosis Virus (AMV).

Für lange Zeit war keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität bei den DNA-Polymerasen höherer Eukaryoten gefunden worden (Chang L.M.S. & Bollum F.J., 1973; Wang T.S.F. 1974; Bollum F.J., 1975; Sedwick W.D. et al., 1975; Sarndgadhara M.G. et al., 1978). Lediglich in den niederen Eukaryoten war sie in Einzelfällen nachweisbar. So in *Euglena gracilis* (McLennan A.G. & Keir H.M., 1975), in Hefe (Helfman W.B., 1973; Wintersberger E., 1974; Chang L.M.S., 1977), in *Ustilago maydis* (Banks G.R. et al., 1976; Yarranton G.Y. & Banks G.R., 1977).

Schließlich fanden aber Mosbaugh D.W. & Meyer R.R. (1978) eine Exonuklease auch in Säugerzellen (Novikoff Hepatoma-Zellen), die mit der DNA-Polymerase β verbunden war.

Diese zeigt gleiche Nukleaseaktivität in 3'→5' wie in 5'→3'-Richtung.

Die Präparationen der C-Polymerase vor und nach der Reinigung über DNA-Cellulose wurden auf Nukleaseaktivitäten untersucht. Die Durchführung der Experimente erfolgte dabei wie unter 3.9 beschrieben.

Die Endonukleasen wurden elektrophoretisch in Agarose-Gelen (s. 3.9.1 und 3.10) getestet. Das Meßprinzip dabei ist, zu prüfen, ob eine kovalent geschlossene zirkuläre DNA (pSF 2124) enzymatisch gespalten werden kann. Da die ringförmige DNA als scharfe Bande auf dem Gel zu sehen ist, lineare Bruchstücke aber nur im unteren Teil des Gels diffus zu erkennen sind, läßt sich mit dieser Methode der Verdau gut nachweisen. Die Abbildung 28 zeigt die Polaroid-Fotografie des Geles.

Es ist zu sehen, daß die Bande der pSF-DNA (Nr. 6) bei Zusatz von Eco RI (Nr. 1), oder einer Polymerase C-Fraktion vor der Reinigung über DNA-Cellulose (also von der Säule DE 52-II; vgl. Abb. 20) verschwindet (Nr. 2 und 3). Sie bleibt aber erhalten, wenn das C-Enzym aus einer Fraktion nach der Reinigung über die DNA-Cellulose-Säule (vgl. Abb. 21) zugegeben wurde (Nr. 4 und 5).

Daraus läßt sich schließen, daß mit der DNA-Polymerase C eine Endonuklease-Aktivität assoziiert ist, die über eine DNA-Cellulose-Säule abgetrennt werden kann.



Abbildung 28: Test auf Endonukleaseaktivität (durchgeführt wie unter 3.9.1 und 3.10 beschrieben).
 (1): + Endonuklease Eco RI; (2) und (3): + DNA-Polymerase C vor der DNA-Cellulose-Säule; (4) und (5): + DNA-Polymerase C nach der DNA-Cellulose-Säule; (6): nur pSF-DNA

Die Anwesenheit von Exonukleasen wurde geprüft durch einen eventuellen Verdau radioaktiv markierter E. coli-DNA.

Etwa 10 µg hochgereinigter Polymerase C wurden hierzu eingesetzt. Der Versuch, wie in 3.9.2 beschrieben, brachte dieses Ergebnis:

Tabelle XXII. TEST AUF ANWESENHEIT VON EXONUKLEASEN

Testbedingungen	3H-Nukleotide im Überstand	
	cpm	ug
ohne C-Polymerase	1 000	0,2
mit C-Polymerase (10 ug)	10 500	3,0

Die Messungen erfolgten wie unter 3.9.2 beschrieben.

Nach Zugabe von 10 ug C-Polymerase in dem Test wurde im säurelöslichen Überstand die 15fache Menge an markierten Nukleotiden gefunden wie ohne diesem Enzym. Daraus läßt sich das Vorhandensein einer Exonukleaseaktivität ableiten.

Es läßt sich hier jedoch nicht entscheiden, ob die Aktivität mit dem C-Enzym nur assoziiert ist, oder aber eine zusätzliche Eigenschaft der Polymerase darstellt.

4.3.12 Molekulargewichtsbestimmung im Glyzeringradienten

Die Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der Glyzeringradientenzentrifugation, die durchgeführt wurde, um das Molekulargewicht der DNA-Polymerase C zu bestimmen.

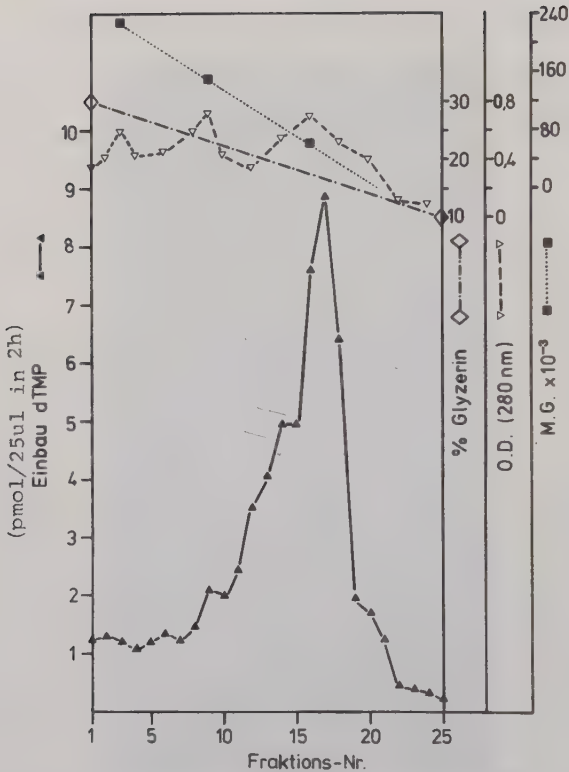


Abbildung 29: Molekulargewichtsbestimmung der DNA-Polymerase C im Glyzeringradienten. Durchführung der Zentrifugation wie unter 3.11 beschrieben. Die Lage der Eichproteine wurde durch Messen der Fraktionen bei 280 nm bestimmt, die der C-Polymerase durch Testen der Fraktionen im Standardansatz (s. 3.4).

Zum Vergleich wurden Katalase (Molekulargewicht 240.000), Aldolase (M.G. 158.000) und BSA (M.G. 68.000) mitzentrifugiert. Aufgrund der linearen Auftrennung von Proteinen im Glyzeringradienten konnte an Hand der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine eine Beziehung zwischen Glyzerinkonzentration und Molekulargewicht aufgestellt werden

(punktierte Linie in Abb. 29). Die Glyzerinkonzentration ließ sich im Refraktometer messen (strichpunktierte Linie in Abb. 29).

Da das Aktivitätsmaximum der C-Polymerase in Fraktion Nr. 17 ermittelt wurde, konnte auf diese Weise das Molekulargewicht dieser Polymerase mit 40.000 d festgelegt werden.

5. DISKUSSION

Da bei der Isolierung von zwei DNA-Polymerasen aus *Neurospora crassa* (Dissertationen Joester W. und Joester K.E., beide in Vorbereitung; Joester W. et al., 1978) Hinweise auf die mögliche Existenz einer dritten gefunden worden waren, war es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, diese dritte Polymerase, wenn möglich, zu isolieren und zu charakterisieren.

Daten über die beiden, von den Autoren mit DNA-Polymerase A und B bezeichneten Enzyme zeigen, daß es sich dabei um Polymerasen handelt, die den α - und γ -Polymerasen der höheren Eukaryoten vergleichbar sind (vgl. hierzu Tabelle XXIII).

Es lag nun die Vermutung nahe, das dritte, zu isolierende Enzym mit der β -Polymerase in Verbindung zu bringen. Allerdings war es bisher noch nie gelungen, eine β -Polymerase aus niederen Eukaryoten zu gewinnen, es wird sogar ihre Existenz bestritten (Wintersberger E., 1974; Wintersberger U., 1974; Banks G.R. et al., 1976).

Nachdem eine Aufarbeitungsmethode gefunden war, mit der die Polymerasen schnell aus großen Mengen Hyphen gereinigt werden konnten, gelang es, eine dritte DNA-Polymerase-Aktivität zu isolieren.

Als erste Vorversuche (vgl. 4.1) zeigten, daß sich diese

dritte Aktivität u.a. in Templatespezifität, Ionenabhängigkeit, pH-Optimum und Sensitivität gegenüber Hemmstoffen unterschied zu dem Verhalten der A- oder B-Polymerase, wurde sie - als ein nicht mit A oder B verwandtes Protein - mit "DNA-Polymerase C" bezeichnet.

Das Enzym verwendet sehr gut das synthetische RNA-Template poly(rA)(dT), nicht dagegen poly(rC)(dG). Ebenfalls gut abgelesen werden poly(dA)(dT) und aktivierte Kalbsthymus-DNA. Dieses Verhalten entspricht exakt den Eigenschaften einer β -Polymerase (Weissbach A., 1977).

Da diese Polymerase auch keine Nukleotide mit oligo(dT) als Template ohne Primer einbaut, ist es keine Terminale Transferase.

Die Ionenabhängigkeit zeigt eine starke Präferenz für Mn^{2+} mit poly(rA)(dT) als Template. Diese Bevorzugung findet sich auch bei der β -Polymerase (Weissbach A., 1975).

Schließlich stimmen auch die Ergebnisse mit den Hemmstoffen mit denen überein, die an β -Polymerasen gefunden wurden (Matsukage A. et al., 1975): die Hemmbarkeit mit pCMB nur in größeren Konzentrationen ($> 0,025$ mmol/l) und die Resistenz gegen NEM. Da diese Stoffe Sulfhydrylgruppen blockieren, ist daraus zu schließen, daß die Polymerase C (wie die β -Polymerase) keine SH-Gruppen zur Reaktivität benötigt. Ebenso wie die β -Polymerase (Wist E., 1979; Ono K. et al., 1979) wird auch das C-Enzym von ddTTP inhibiert.

Die Versuche zur Konzentrierung (vgl. 4.2) brachten noch

weitere Fakten, die das C-Enzym als β -Polymerase erkennen lassen: die Inaktivität bei $\text{pH} < 4,5$ (Weissbach A., 1975) und die Sensitivität gegen $> 20\%$ Äthanol (Weissbach A., 1975; Sarndgadhara M.G. et al., 1978).

Daß die Einengungen mit den anderen beschriebenen Methoden zu so großen Aktivitätsverlusten führten, mag auf sekundäre Effekte zurückzuführen sein. Da das Enzym bei Kühlraumtemperatur nur einige Stunden voll aktiv bleibt, diese Versuche aber stets mehrstündiges Arbeiten bei 40°C und Dialysen über Nacht erforderten, wird die Polymerase dabei wohl inaktiviert worden sein.

Im "batch"-Verfahren mit DEAE-Cellulose, einer sehr raschen und doch schonenden Methode, konnte dann der entscheidende Konzentrierungsschritt (vgl. 4.2) durchgeführt werden.

Die weitere Charakterisierung des C-Enzyms (vgl. 4.3) brachte dann zunächst den einwandfreien immunologischen Beweis, daß diese Polymerase, wie bereits angenommen, ein Enzym darstellt, das mit den beiden anderen Polymerasen A und B keine strukturellen Ähnlichkeiten aufweist. Die Antikörper gegen C zeigten keine Kreuzreaktion mit A oder B und umgekehrt. Dasselbe wurde auch für die β -Polymerase im Vergleich mit α und γ gezeigt (Spadari S. et al., 1974; Smith R.G. et al., 1975).

Nachdem die Polymerase C das synthetische RNA-Template poly(rA)(dT) ablesen konnte, folgte ein Test auf Reverse

Transkriptase Aktivität. Jedoch war eine solche mit der natürlichen Globin-mRNA nicht festzustellen. Es handelt sich bei dem C-Enzym also auf keinen Fall um eine Reverse Transkriptase. Eben dieselbe Eigenschaft wurde auch für die β -Polymerase bewiesen (Chang L.M.S. & Bollum F.J., 1972; Spadari S. & Weissbach A., 1975; Tsuruo T. et al., 1975).

Es war nun sicher, daß es sich bei der DNA-Polymerase C um ein den β -Polymerasen höherer Eukaryoten vergleichbares Enzym handelt. So folgten Versuche zur Bestimmung weiterer Eigenschaften. Da dazu noch keine Vergleichswerte aus anderen Arbeiten vorliegen, können sie nur als weitere Daten zur erstmaligen Charakterisierung angesehen werden.

Die Molekulargewichtsbestimmung im Glyzeringradienten allerdings brachte zum Schluß einen weiteren Beweis für die Übereinstimmung mit den β -Polymerasen: die C-Polymerase weist das gleiche M.G. von etwa 40.000 d auf (Chang L.M.S. & Bollum F.J., 1972; Spadari S. & Weissbach A., 1974; Wang T.S.F. et al., 1974).

In einem Punkt unterscheidet sich die Polymerase C aber von der von Chang L.M.S. & Bollum F.J. (1972) und von Wang T.S.F. und Mitarbeitern (1974) beschriebenen β -Polymerase. Im Gegensatz zu dieser ist mit dem C-Enzym Nukleaseaktivität assoziiert. Einmal eine Endonuklease, die nach der Reinigung über DNA-Cellulose verloren geht, und zum zweiten eine Exonuklease, die bis nach dem letzten Reinigungsschritt erhalten blieb. Damit kann aber nicht behauptet werden, daß die C-Polymerase Nukleaseaktivität aufweist. Es besteht die

Möglichkeit, daß eine Exonuklease sich mit den durchgeführten Isolierungsmethoden nicht abtrennen läßt.

Andere Autoren allerdings berichten in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis ebenfalls über eine Verbindung von β -Polymerasen und Nukleasen, sowohl in niederen Eukaryoten (Helfman W.B., 1973; Wintersberger E., 1974; McLennan A.G. & Keir H.M., 1975; Banks G.R. et al., 1976; Chang L.M.S., 1977; Yarranton G.Y. & Banks G.R., 1977), als auch bei höheren (Mosbaugh D.W. & Meyer R.R., 1978). Bei letzteren wurde sogar gezeigt, daß die Polymerase- und die Nukleaseaktivität im Glyzeringradienten an gleicher Stelle bandieren, was dafür spricht, daß die Polymerase tatsächlich zusätzlich die Eigenschaften einer Nuklease hat.

Die nachstehende Tabelle XXIII gibt nochmals einen Überblick der wesentlichen Eigenschaften der DNA-Polymerasen A, B und C aus *Neurospora crassa*:

Tabelle XXIII. VERGLEICH DER POLYMERASEN A, B UND C

	A	B	C
Molekulargewicht	147.000 d*	110.000 d*	40.000 d
Elution von DE22 (mol/l KCl)	0,18	0,35	0,60
Optima:			
K ⁺	5-70 mmol/l*	45 mmol/l*	2-20 mmol/l
Mg ²⁺	4 mmol/l*	6 mmol/l*	4 mmol/l
Mn ²⁺	2 mmol/l*	0,8 mmol/l*	0,8 mmol/l
Präferenz Mg/Mn	Mg > Mn	Mg > Mn	Mg < Mn
Templatespez.	KT>>dA>>>rA	KT>dA>>>rA	rA>>dA,KT
Hemmung durch:			
pCMB	+	+	+
NEM	+	+	0
Actinomycin D	n.g.	n.g.	-
Temperaturoptimum	37° C	37° C	20° C
pH-Optimum	8,2 *	8,2 *	8,0

n.g. = nicht getestet

* = Daten aus Joester W. et al., 1978 übernommen

Zusammenfassend kann nun gesagt werden, daß es sich bei der aus *Neurospora crassa* isolierten DNA-Polymerase C um ein Enzym handelt, das den β -Polymerasen höherer Eukaryoten entspricht.

Damit ist es erstmals gelungen, eine solche niedermolekulare DNA-Polymerase aus einem niederen Eukaryoten zu isolieren und somit die Lücke, die sich aus dem scheinbaren Fehlen eines solchen Enzyms zwischen Prokaryoten und Eukaryoten ergeben hat, zu schließen.

Eine mögliche Erklärung dafür, daß bisher noch keine β -ähnliche Polymerase in niederen Eukaryoten gefunden worden ist, wäre, daß die β -Polymerase in wachsenden Zellen nur in extrem geringen Mengen vorliegt und erst im Ruhezustand ihre höchste Aktivität zeigt (Craig R.K. et al., 1975). Aus diesem Grunde wird auch vermutet, daß sie nur eine Rolle im Reparaturmechanismus spielt (Sarndgadharan M.G. et al., 1978).

Da nun für die hier beschriebenen Versuche große Ausgangsmengen an Hyphen benötigt wurden und diese nicht in einem Ansatz gezüchtet werden konnten, wurden die Zellen zwischendurch in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei der Aufarbeitung befanden sie sich also nicht mehr im Wachstumsstadium.

Die zwischenzeitliche Lagerung bei -100°C liefert gleichzeitig noch eine zweite Erklärungsmöglichkeit:

Mehrere Autoren (Hecht N.B., 1973; Hecht N.B. & Davidson D., 1973) haben eine Theorie entwickelt, nach der die β -Polymerase zumindest anfangs eine Untereinheit der α -Polymerase ist, die in Gegenwart von Salz abgetrennt wird. Darauf aufbauende Versuche von Tanabe K. und Takahashi T.

(1973) zeigten dann, daß nach Lagerung unter 0°C nach 7 bis 10 Tagen die Konzentration einer hochmolekularen Polymerase, sensitiv gegen NEM, zurückgeht und die einer niedermolekularen, die sich als resistent gegen NEM erwies, anstieg. Das bedeutet, auf die Polymerasen bezogen, daß die Menge der α - zugunsten der β -Polymerase abgenommen hat. Inwieweit diese Theorie zutreffend ist, bleibt abzuklären. Besonders muß dann begründet werden, weshalb im Immuntest (vgl. 4.3.1) keine Kreuzreaktionen auftreten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Polymerase C ca. 3700fach gereinigt. Das entspricht, verglichen mit Enzympräparationen anderer Autoren, einer guten Anreicherung. Das Enzym kann aber keineswegs als "rein" bezeichnet werden. Dazu müßten weitere Schritte folgen. Vor allem die Abtrennung der Exonukleaseaktivität müßte noch mit anderen Mitteln versucht werden.

Die Reinigung war aber genügend, um die Charakterisierung soweit durchzuführen, daß die C-Polymerase aus *Neurospora crassa* als β -Polymerasen-Typ identifiziert werden konnte.

Weitere Studien sollten jetzt vor allem darauf ausgerichtet werden, die Bedeutung dieser Polymerase in vivo zu prüfen. UV-sensitive Mutanten einerseits (pol^{-} -Mutanten; Bedeutung der β -Polymerase im Reparatursystem?) und die Verwendung verschiedener Differenzierungsstadien von *Neurospora* andererseits (verschiedene Aufgaben während der Entwicklung?) bieten dazu gute Möglichkeiten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zunächst wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, große Mengen *Neurospora crassa* Hyphen rasch aufzuarbeiten.

Dadurch gelang es, eine dritte DNA-Polymerase aus diesem niederen Eukaryotenpilz zu gewinnen.

Nach einem ersten Reinigungsschritt brachten Vorversuche Hinweise darauf, daß es sich dabei um ein Enzym handeln könnte, das den β -Polymerasen höherer Eukaryoten ähnlich ist.

Nach einer 3700fachen Anreicherung konnte das Enzym wie folgt charakterisiert werden:

- (1) das Molekulargewicht beträgt 40.000 d;
- (2) die Elution von der DEAE-Cellulose erfolgt bei 0,60 mol/l KCl;
- (3) die Ionenoptima betragen: für Mangan 0,8 mmol/l, für Magnesium 4 mmol/l, für Kalium 2 bis 20 mmol/l;
- (4) die Präferenz für divalente Kationen liegt bei Mangan;
- (5) das Temperaturoptimum liegt bei 20° C;
- (6) das Enzym ist temperaturstabil bis 45° C;
- (7) die Polymerase bleibt bei < -80° C über lange Zeit

- (wenigstens 1 Jahr) aktiv;
- (8) das pH-Optimum beträgt 8,0;
- (9) der isoelektrische Punkt pI liegt bei 5,1;
- (10) die Fällkonzentration mit Ammoniumsulfat ist bei 1,25 mol/l erreicht;
- (11) die Michaelis-Konstante wurde bestimmt mit $K_m = 1,5 \text{ umol/l}$ für dTTP als Substrat;
- (12) die Polymerase C ist mit einer Exonuklease assoziiert, sowie mit einer Endonuklease, die aber über DNA-Cellulose abgetrennt werden kann;
- (13) das Enzym wird gehemmt durch pCMB, ddTTP, EDTA und zum Teil von nichtionischen Detergentien (Triton X 100), nicht aber durch NEM und Actinomycin D; es wird stimuliert durch DMSO;
- (14) auch die Templatepräferenz weist es als β -Polymerase aus: rA $\gg$ dA = KT-DNA.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B., Herrick G. :
DNA-Cellulose Chromatography.
Methods in Enzymology 21, 198 - 217 (1971)
- Alberts B., Sternglanz R. :
Recent excitement in the DNA replication problem.
Nature 269, 655 - 661 (1977)
- Alberts B.M., Fry L. :
T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the
replication and recombination of DNA.
Nature 227, 1313 - 1317 (1970)
- Aposhian H.V., Kornberg A. :
Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.
J. Biol. Chem. 237, 519 - 525 (1962)
- Avery O.T., MacLeod C.M., MacCarty M. :
Studies on the chemical nature of the substance inducing
transformation of pneumococcal types. Induction of trans-
formation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated
from pneumococcus type III.
J. exp. Med. 79, 137 - 159 (1944)
- Bailey J.L. :
Techniques in Protein Chemistry.
Elsevier, Amsterdam (1967)
- Banks G.R., Holloman W.K., Kairis M.V., Spanos A.,
Yarranton G.T. :
A DNA Polymerase from *Ustilago maydis*.
Eur. J. Biochem. 62, 131 - 142 (1976)
- Bauer G. :
Isolierung und Eigenschaften einer neuen Reversen Tran-
skriptase im Hühnersystem.
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München
(1976)
- Bauer G., Hofschneider P.H. :
A RNA-dependent DNA polymerase, different from the known
viral reverse transcriptases, in the chicken system.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3025 - 3029 (1976)
- Bautz E.K.F. :
Regulation of RNA Synthesis.
Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 12, 129 - 160 (1972)

- Benz jr. E.W., Reinberg D., Vicuna R., Hurwitz J. :
Initiation of DNA Replication by the dnaG Protein.
J. Biol. Chem. 255, 1096 - 1106 (1980)
- Bessman M.J., Lehman I.R., Simms E.S., Kornberg A. :
Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.
J. Biol. Chem. 233, 171 - 177 (1958)
- Bio-Rad :
Katalog E, 1979.
Bio-Rad Laboratories, Richmond, California (1979)
- Blatt W.F. :
Ultrafiltration for Enzyme Concentration.
Methods in Enzymology 22, 39 - 49 (1971)
- Bolden A., Pedrali Noy G., Weissbach A. :
DNA Polymerase of Mitochondria is a γ -Polymerase.
J. Biol. Chem. 252, 3351 - 3356 (1977)
- Bollum F.J. :
Calf Thymus Polymerase.
J. Biol. Chem. 235, 2399 - 2403 (1960)
- Bollum F.J. :
Mammalian DNA Polymerases.
Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol. 15, 109 - 144 (1975)
- Bollum F.J., Chang L.M.S., Tsiapalis C.M., Dorson J.W. in :
Methods in Enzymology 29, 70 - 81 (1974)
- Bollum F.J., Potter V.R. :
Thymidine Incorporation into Deoxyribonucleic Acid of Rat Liver Homogenates.
J. Am. Chem. Soc. 79, 3603 - 3604 (1957)
- Brissac C., Rucheton M., Brunel C., Jeanteur P. :
Binding of HeLa DNA Polymerase α to Blue Dextran.
FEBS Letters 61, 38 - 41 (1976)
- Brockman W.W., Gutai M.W., Nathans D. :
Evolutionary variants on simian virus 40.
Virology 66, 36 - 52 (1975)
- Brutlag D., Kornberg A. :
Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.
J. Biol. Chem. 247, 241 - 248 (1972)
- Busch H. :
Isolation and Purification of Nuclear Proteins.
Methods in Enzymology 12 B, 65 - 84 (1968)
- Byrnes J.J., Black V.L. :
Comparison of DNA Polymerases α and δ from Bone Marrow.
Biochemistry 17, 4226 - 4231 (1978)

- Byrnes J.J., Downey K.M., Black V.L., So A.G. :
A New Mammalian DNA Polymerase with 3' to 5' Exonuclease
Activity: DNA Polymerase δ .
Biochemistry 15, 2817 - 2823 (1976)
- Byrnes J.J., Downey K.M., Que B., Lee M., Black V., So A.G.:
Selective Inhibition of the 3' to 5' Exonuclease Activity
Associated with DNA Polymerases.
Biochemistry 16, 3740 - 3746 (1977)
- Carlson J.O., Wang J.C. :
A DNA-Cellulose Procedure for the Purification of the
Escherichia coli Protein ω .
Methods in Molecular Biology 7, 231 - 238 (1974)
- Chang L.M.S. :
DNA Polymerases from Baker's Yeast.
J. Biol. Chem. 252, 1873 - 1880 (1977)
- Chang L.M.S., Bollum F.J. :
A Chemical Model for Transcriptional Initiation of
DNA Replication.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1354 - 1360 (1972)
- Chang L.M.S., Bollum F.J. :
A Comparison of Associated Enzyme Activities in Various
Deoxyribonucleic Acid Polymerases.
J. Biol. Chem. 248, 3398 - 3404 (1973)
- Clausen J. :
Immunochemical Techniques for the Identification and
Estimation of Macromolecules.
North-Holland, Amsterdam (1971)
- Craig R.K., Costello P.A., Keir H.M. :
Deoxyribonucleic Acid Polymerases of BHK-21/c13 cells.
Biochem. J. 145, 233 - 240 (1975)
- Cuatrecasas P. :
Protein Purification by Affinity Chromatography.
J. Biol. Chem. 245, 3059 - 3065 (1970)
- Cuatrecasas P., Anfinsen C.B. :
Affinity Chromatography.
Methods in Enzymology 22, 345 - 378 (1971)
- Determann H. :
Gel Chromatography.
Springer, New York (1969)
- Dube D.K., Seal G., Loeb L.A. :
Differential Heat Sensitivity of Mammalian DNA Polymerases.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 483 - 487 (1977)

- Dupraw E.J. :
DNA and Chromosomes.
Holt, Rinehart and Winston, New York (1970)
- Elassouli S.M., Mishra N.C. :
DNA-Polymerase from *Neurospora crassa*.
Genetics 86, Suppl. 2, s18 (1977)
- Fisher L. :
An Introduction to Gel Chromatography.
American Elsevier, New York (1969)
- Gardner J.M., Kado C.I. :
High Molecular Weight Deoxyribonucleic Acid Polymerase from
Crown Gall Tumor Cells of Periwinkle (*Vinca rosea*).
Biochemistry 15, 688 - 697 (1976)
- Golomb M., Grandgenett D.P. :
Endonuclease Activity of Purified RNA-directed DNA Polyme-
rase from Avian Myeloblastosis Virus.
J. Biol. Chem. 254, 1606 - 1613 (1979)
- Gundlach G., Dillmann A. :
Bericht über das neue SI - Einheitensystem.
Hoppe-Seyler's Z. f. Phys. Chemie 358, X - XIV (1977)
(31. Rundschreiben der Ges. f. Biol. Chemie)
- Günther O. :
Adjuvantien - Fortschritte und Probleme.
Forum Mikrobiologie 1, 20 - 21 (1979)
- Hasslewood I.P., Holmes A.M., Wakeling W.F., Johnston I.R. :
Studies on the Purification and Properties of a 6.8-S DNA
Polymerase Activity Found in Calf-Thymus DNA Polymerase-
Fraction.
Eur. J. Biochem. 84, 123 - 131 (1978)
- Hecht N.B. :
Interconvertibility of Mouse DNA Polymerase Activities
Derived from the Nucleus and Cytoplasm.
Biochim. Biophys. Acta 312, 471 - 483 (1973)
- Hecht N.B., Davidson D. :
The Presence of a Common Active Subunit in Low and High
Molecular Weight Murine DNA Polymerase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 299 - 305 (1973)
- Heftmann E., ed. :
Chromatography.
Reinhold Publ. Corp., New York (1967)
- Helfman W.B. :
The Presence of an Exonuclease in Highly Purified DNA
Polymerase from Baker's Yeast.
Eur. J. Biochem. 32, 42 - 50 (1973)

- Himmelhoch S.R. :
Chromatography of Proteins on Ion-Exchange Adsorbents.
Methods in Enzymology 22, 273 - 286 (1971)
- Holmes A.M., Johnston I.R. :
DNA-Polymerases of Eukaryotes.
FEBS-Letters 60, 233 - 243 (1975)
- Jeggo P.A., Unrau P., Banks G.R., Holliday R. :
A Temperature Sensitive DNA Polymerase Mutant of
Ustilago maydis.
Nature New Biol. 242, 14 - 16 (1973)
- Joester K.E. :
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München,
in Vorbereitung
- Joester K.E., Joester W.M., Hofschneider P.H. :
DNA-dependent DNA-polymerases from *Neurospora crassa*.
Neurospora Newsletter 24, 8 (1977)
- Joester W. :
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München,
in Vorbereitung
- Joester W., Joester K.E., van Dorp B., Hofschneider P.H. :
Purification and properties of DNA-dependent DNA-
polymerases from *Neurospora crassa*.
Nucl. Ac. Res. 5, 3043 - 3055 (1978)
- Kalf G.F., Ch'ih J. J. :
Purification and Properties of Deoxyribonucleic Acid
Polymerase from Rat Liver Mitochondria.
J. Biol. Chem. 243, 4904 - 4916 (1968)
- Kang C.Y., Temin H.M. :
Endogenous RNA-directed DNA Polymerase Activity in Unin-
fected Chicken Embryos.
Nature New Biol. 242, 206 - 208 (1973)
- Kornberg A. :
Biologic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.
Science 131, 1503 - 1508 (1960)
- Kornberg A. :
DNA synthesis.
W.H. Freeman and Company, San Francisco (1974)
- Kornberg A. :
The Enzymatic Replication of DNA.
Critical Rev. Biochem. Vol. 7, 23 - 43 (1979)

- Kornberg A., Lehman I.R., Simms E.S. :
Polydesoxyribonucleotide Synthesis by Enzymes from
Escherichia coli.
Federation Proc. 15, 291 - 292 (1956)
- Kornberg T., Gefter M.L. :
DNA Synthesis in cell-free extracts of a DNA Polymerase-
defective mutant.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1348 - 1355 (1970)
- Kornberg T., Gefter M.L. :
Purification and DNA Synthesis in Cell-Free Extracts:
Properties of DNA Polymerase II.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 761 - 764 (1971)
- Lai C.J., Nathans D. :
Non specific termination of SV40 DNA replication.
J. Mol. Biol. 97, 113 - 118 (1975)
- Lee M.Y.W.T., Tan C.K., So A.G., Downey K.M. :
Purification of Deoxyribonucleic Acid Polymerase δ
from Calf Thymus.
Biochemistry 19, 2096 - 2101 (1980)
- Lehman I.R., Bessman M.J., Simms E.S., Kornberg A. :
Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.
J. Biol. Chem. 233, 163 - 170 (1958)
- Leighton T.J., Dill B.C., Stock J.J., Phillips C. :
Absence of Histones from the Chromosomal Proteins of Fungi.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 677 - 680 (1971)
- Livingston D.M., Serxner L.E., Howk D.J., Hudson J.,
Todaro G.J. :
Characterization of a New Murine Cellular DNA Polymerase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 57 - 62 (1974)
- Loomis L.W., Rossomando E.F., Chang L.M.S. :
DNA Polymerase of *Dictyostelium Discoideum*.
Biochim. Biophys. Acta 425, 469 - 477 (1976)
- Lowe C.R., Dean P.D.G. :
Affinity Chromatography.
John Wiley & Sons, London (1974)
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. :
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- Luck D.J.L. :
Preparation of Mitochondrial Fractions from *Neurospora crassa*.
Methods in Enzymology 12 A, 465 - 468 (1967)

- Martin S.M. (ed.) :
Culture Collections: Perspectives and Problems.
University of Toronto Press, Toronto (1963)
- Matsukage A., Bohn E.W., Wilson S.H. :
Differential Sensitivity of Low Molecular Weight DNA Polymerase to Sulfhydryl-Blocking Reagents.
Biochim. Biophys. Acta 383, 338 - 343 (1975)
- McLennan A.G., Keir H.M. :
Deoxyribonucleic Acid Polymerases of *Euglena gracilis*.
Biochem. J. 151, 227 - 238 (1975)
- McPhie P. :
Dialysis.
Methods in Enzymology 22, 23 - 32 (1971)
- Meselson M., Stahl F.W. :
Replication of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 671 - 682 (1958)
- Mondal H. :
Occurrence of Particle-bound Reverse Transcriptase in Human Amniotic Fluid.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 67 - 75 (1977)
- Mordoh J., Fridlender B.R. :
A modified nuclear DNA Polymerase in a case of acute lymphoblastic Leukemia.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 888 - 896 (1975)
- Mosbaugh D.W., Meyer R.R. :
Exonuclease Associated with a Purified Mammalian DNA-Polymerase.
J. Cell Biol. 79, A119 (1978)
- Müller W., Crothers D.M. :
Studies of the Binding of Actinomycin and Related Compounds to DNA.
J. Mol. Biol. 35, 251 - 290 (1968)
- Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.) :
Methods in Microbiology, Vol. 1
Academic Press, New York (1969)
- Ono K., Ogasawara M., Matsukage A. :
Inhibition of the Activity of DNA Polymerase α by 2',3'-Dideoxythymidine-5'-triphosphate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 1255 - 1262 (1979)
- Que B.G., Downey K.M., So A.G. :
Selective Inhibition of the Polymerase Activity of DNA Polymerase.
Biochemistry 18, 2064 - 2068 (1979)

- Rhodes C., Germershausen J., Suskind S.R. :
Neurospora crassa: Preparative Scale for Biochemical Studies.
 Methods in Enzymology 22, 80 - 86 (1971)
- Richardson C.C., Lehmann I.R., Kornberg A. :
 A Deoxyribonucleic Acid Phosphatase-Exonuclease from *Escherichia coli*.
 J. Biol. Chem. 239, 251 - 258 (1964)
- Romashchenko A.G., Vorob'ava N.V., Kozhemyakina N.N.,
 Potapov V.A., Sidel'nikova N.P., Staroobrazova M.G.,
 Salgnik R.I. :
 RNA-dependent DNA Polymerase of *Escherichia coli*.
 Doklady Akademii Nauk SSSR 233, 734 - 737 (1977)
- Sarndgadhara M.G., Robert-Guroff M., Gallo R.C. :
 DNA Polymerases of Normal and Neoplastic Mammalian Cells.
 Biochim. Biophys. Acta 516, 419 - 487 (1978)
- Schaffner W., Weissmann C. :
 A Rapid, Sensitive, and Specific Method for the Determination of Protein in Dilute Solution.
 Anal. Biochem. 56, 502 - 514 (1973)
- Sedwick W.D., Wang T.S.F., Korn D. :
 "Cytoplasmic" Deoxyribonucleic Acid Polymerase.
 J. Biol. Chem. 250, 7045 - 7056 (1975)
- Smith R.G., Abrell J.W., Lewis B.J., Gallo R.C. :
 Serological Analysis of Human Deoxyribonucleic Acid Polymerases.
 J. Biol. Chem. 250, 1702 - 1709 (1975)
- Spadari S., Muller R., Weissbach A. :
 The Dissimilitude of the Low and High Molecular Weight Deoxyribonucleic Acid-dependent Deoxyribonucleic Acid Polymerases of HeLa Cells.
 J. Biol. Chem. 249, 2991 - 2992 (1974)
- Spadari S., Weissbach A. :
 The Dissimilitude of the Low and High Molecular Weight Deoxyribonucleic Acid-dependent Deoxyribonucleic Acid Polymerases of HeLa Cells.
 J. Biol. Chem. 249, 2991 - 2992 (1974)
- Spadari S., Weissbach A. :
 RNA-primed DNA Synthesis.
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 503 - 507 (1975)
- Taber W.A., Taber R.A. :
 The Ascomycetes, in:
 Handbook of Microbiology, CRC Press, Cleveland (1974)
 (Laskin A.I., Lechevalier H.A., eds.)

- Tanabe K., Takahashi T. :
Conversion of DNA Polymerase Extracted from Rat Ascites
Hepatoma Cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 295 - 301 (1973)
- Temin H.M., Kang C.Y., Mizutani S. :
Endogenous RNA-directed DNA Polymerase Activity in Normal
Cells.
Johns Hopkins Med. J. Suppl. 2, 141 - 156 (1973)
- Thompson S., Cass K.H., Stellwagen E. :
Blue Dextran-Sepharose: An Affinity Column for the Di-
nucleotide Fold on Proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 669 - 672 (1975)
- Tiselius A., Hjerten S., Levin Ö. :
Protein Chromatography on Calcium Phosphate Columns.
Arch. Biochem. Biophys. 65, 132 - 155 (1956)
- Topal M.D., Fresco J.R. :
Complementary Base Pairing and the Origin of Substitution
Mutations.
Nature 263, 285 - 289 (1976)
- Tsuruo T., Hirayama K., Ukita T. :
Three DNA Polymerases of Rat Ascites Hepatoma Cells.
Biochim. Biophys. Acta 383, 274 - 281 (1975)
- Vogel H.J. :
A Convenient Growth Medium for Neurospora (Medium N).
Microbial Genet. Bull. 13, 42 - 44 (1956)
- Wang T.S.F., Fisher P.A., Sedwick W.D., Korn D. :
Identification of a New DNA Polymerase Activity in
Human KB Cells.
J. Biol. Chem. 250, 5270 - 5272 (1975)
- Wang T.S.F., Sedwick D., Korn D. :
Nuclear Deoxyribonucleic Acid Polymerase.
J. Biol. Chem. 249, 841 - 850 (1974)
- Watson J.D., Crick F.H.C. :
Genetical implications of the structure of deoxyribose
nucleic acid.
Nature 171, 964 - 967 (1953)
- Weinstein B.I., Bhardwaj N., Li H.C. :
A Rapid and Accurate Procedure for Assaying DNA Polymerase,
RNA Polymerase, or Ribosome Dependent Protein Synthesis.
Anal. Biochem. 68, 62 - 69 (1975)
- Weiss H., v. Jagow G., Klingenberg M., Bücher T. :
Characterization of Neurospora crassa Mitochondria Prepared
with a Grind-Mill.
Eur. J. Biochem. 14, 75 - 82 (1970)

- Weissbach A. :
The Functional Role of Mammalian DNA Polymerase.
Arch. Biochem. Biophys. 198, 386 - 396 (1979)
- Weissbach A. :
Vertebrate DNA Polymerases.
Cell 5, 101 - 108 (1975)
- Weissbach A. :
Eukaryotic DNA Polymerases.
Ann. Rev. Biochem. 46, 25 - 47 (1977)
- Weissbach A., Baltimore D., Bollum F., Gallo R., Korn D. :
Nomenclature of Eukaryotic DNA Polymerases.
Eur. J. Biochem. 59, 1 - 2 (1975)
- Weissbach A., Schlabach A., Fridlender B., Bolden A. :
DNA Polymerases from Human Cells.
Nature New Biol. 231, 167 - 170 (1971)
- Wilson J.E. :
Applications of Blue Dextran and Cibacron Blue F3GA in
Purification and Structural Studies of Nucleotide-Requiring
Enzymes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 816 - 823 (1976)
- Wintersberger E. :
Deoxyribonucleic Acid Polymerases from Yeast.
Eur. J. Biochem. 50, 41 - 47 (1974)
- Wintersberger U. :
Absence of a low molecular weight DNA polymerase from
nuclei of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.
Eur. J. Biochem. 50, 197 - 202 (1974)
- Wist E. :
The Role of DNA Polymerases α , β , and γ in Nuclear DNA
Synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 562, 62 - 69 (1979)
- Wu A.M., Cetta A. :
On the Stimulation of Viral DNA Polymerase Activity
by Nonionic Detergent.
Biochemistry 14, 789 - 795 (1975)
- Wu A.M., Gallo R.C. :
Reverse Transcriptase.
Critical Rev. Biochem. 3, 289 - 347 (1975)

Yarranton G.Y., Banks G.R. :

A DNA Polymerase from *Ustilago maydis*.

Eur. J. Biochem. 77, 521 - 527 (1977)

Yoshida S., Kondo T., Ando T. :

Multiple Molecular Species of Cytoplasmic DNA Polymerase
from Calf Thymus.

Biochim. Biophys. Acta 353, 463 - 474 (1974)

APPENDIX 1: Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider möchte ich für Arbeitsplatz, Mittel und Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit, sowie für sein persönliches Interesse danken.

Bei der Max-Planck-Gesellschaft bedanke ich mich für das Promotionsstipendium.

Herrn Prof. Dr. H. Schmieger danke ich für die Vertretung dieser Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Weiterhin möchte ich Frau W. Joester und Herrn K.-E. Joester danken, die mir, besonders zu Beginn der Arbeit, stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt Frl. H. Riesemann, die mir bei der Durchführung der Versuche tatkräftig geholfen hat.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe eines VAX/VMS V01 - Computers geschrieben. Für Unterstützung dabei danke ich dem Rechenzentrum des MPI für Biochemie.

APPENDIX 2: Lebenslauf

Am 29. Oktober 1949 wurde ich als Kind des Kraftwagenfahrers Josef Stauder und seiner Ehefrau Anna, geb. Lang, in München geboren.

Nachdem wir aus beruflichen Gründen 1954 nach Immenstadt im Allgäu verzogen waren, besuchte ich von 1956 bis 1960 die dortige Volksschule und von 1960 bis 1963 die Kloster-Oberrealschule St. Maria Stern.

Da an dieser Schule Knaben nur bis zur dritten Klasse unterrichtet wurden, wechselte ich 1963 an das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Oberstdorf, wo ich 1969 das Abitur ablegte.

Zum Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich für das Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich aber auf ärztliches Anraten 1972 nach einer Phosphorvergiftung abbrechen mußte.

Im Sommersemester 1972 nahm ich mein Studium der Biologie auf. Im Frühjahr 1974 legte ich die Diplomvorprüfung und im Herbst 1976 die Diplomhauptprüfung ab. Meine Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Klingmüller am Genetischen Institut der Universität München beschäftigte sich mit der Transkription prokaryotischer DNA in eukaryoten Zellen. Im Sommer 1977 erhielt ich daraufhin das Diplom in Biologie.

Am 1. August 1977 begann ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München als Stipendiat meine Promotionsarbeit. Sie entstand unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider.

Seit dem 1. April 1980 bin ich mit der Diplom-Biologin Dr. Ursula Stauder, geb. Buch, verheiratet.

